

ケヤマハンノキをモデルとした窒素固定樹種の光合成の
ダウンレギュレーション回避メカニズムと生態系への影響

飛田博順

2012

Tobita, H. (2012) Physiological avoidance mechanism of photosynthetic down-regulation under elevated CO₂ in nitrogen-fixing actinorhizal plants, *Alnus hirsuta* Turcz., and its effects on rehabilitation of forest ecosystems.

目 次

第1章 序論	9
1. 1 森林生態系の窒素循環における窒素固定の役割	10
1. 2 アクチノリザル植物とフランキアの共生的生物窒素固定	11
1. 3 天然更新林分での窒素固定能力の把握	12
1. 4 生育環境の資源量変化に対する光合成・成長応答	14
1. 4. 1 窒素固定樹種の窒素固定能力と光合成能力の間のフィードバック	14
1. 4. 2 光合成能力のシンク・ソースバランス制御	14
1. 4. 3 CO ₂ 濃度上昇に対する光合成反応	15
1. 4. 4 窒素固定樹種の CO ₂ 濃度上昇に対する応答	16
1. 4. 5 土壌窒素供給量の影響	17
1. 4. 6 土壌リン酸供給量の影響	18
1. 4. 7 土壌水分条件の影響	18
1. 4. 8 樹木個体レベルの CO ₂ 濃度上昇に対する応答	19
1. 4. 9 落葉の性質に及ぼす CO ₂ 濃度上昇の影響	20
1. 4. 10 実験手法について	21
1. 5 本研究の目的と本文の構成	21
第2章 人為的な土壌攪乱後に天然更新したケヤマハンノキ林分における窒素固定	23
2. 1 ケヤマハンノキ天然更新林分における根粒の水平分布とバイオマス	23
2. 1. 1 背景	23
2. 1. 2 材料と方法	25
2. 1. 2. 1 調査地	25
2. 1. 2. 2 ケヤマハンノキの分布様式	25
2. 1. 2. 3 根粒の水平分布、サイズ構造、バイオマス	26
2. 1. 2. 4 統計解析	28
2. 1. 3 結果	29

2. 1. 3. 1	ケヤマハンノキの分布	…… 29
2. 1. 3. 2	根粒数の水平分布	…… 29
2. 1. 3. 3	根粒のサイズ構造	…… 29
2. 1. 3. 4	根粒バイオマスの水平分布	…… 30
2. 1. 4	考察	…… 31
2. 1. 4. 1	根粒数の水平分布	…… 31
2. 1. 4. 2	根粒のサイズ構造	…… 32
2. 1. 4. 3	根粒バイオマス	…… 33
2. 1. 4. 4	根粒バイオマスの推定方法	…… 33
2. 1. 4. 5	まとめ	…… 34
2. 2	ケヤマハンノキの成長様式、ニトロゲナーゼ活性、林分内の窒素動態	…… 43
2. 2. 1	背景	…… 43
2. 2. 2	材料と方法	…… 45
2. 2. 2. 1	成長様式	…… 45
2. 2. 2. 2	リターフォール	…… 46
2. 2. 2. 3	野外条件での根粒のニトロゲナーゼ活性の季節変化	…… 46
2. 2. 2. 4	林分あたりの窒素固定量の推定	…… 48
2. 2. 2. 5	リターバック法	…… 49
2. 2. 2. 6	林床有機物と鉱物質土壌	…… 49
2. 2. 2. 7	化学分析	…… 50
2. 2. 2. 8	統計解析	…… 50
2. 2. 3	結果	…… 51
2. 2. 3. 1	フェノロジー	…… 51
2. 2. 3. 2	リターフォール	…… 51
2. 2. 3. 3	根粒のニトロゲナーゼ活性の季節変化	…… 52
2. 2. 3. 4	窒素固定量の推定	…… 52
2. 2. 3. 5	リターフォールによる窒素動態	…… 53
2. 2. 3. 6	葉リターの分解	…… 54
2. 2. 3. 7	林床有機物	…… 54

2. 2. 3. 8	土壌中の窒素蓄積量	55
2. 2. 4	考察	55
2. 2. 4. 1	ニトロゲナーゼ活性の季節変化	55
2. 2. 4. 2	林分内の窒素循環に対する窒素固定の寄与	56
2. 2. 4. 3	林分内の窒素循環	58
2. 2. 4. 4	ニトロゲナーゼ活性の推定方法	60
2. 2. 4. 5	まとめ	61
2. 3	林床の更新樹種の空間分布様式	75
2. 3. 1	背景	75
2. 3. 2	材料と方法	76
2. 3. 2. 1	調査地	76
2. 3. 2. 2	更新樹種	76
2. 3. 2. 3	更新樹種の空間分布解析	76
2. 3. 3	結果	77
2. 3. 3. 1	ケヤマハンノキの空間分布	77
2. 3. 3. 2	更新樹種の樹種構成	77
2. 3. 3. 3	更新樹種の分布様式	78
2. 3. 3. 4	更新樹種とケヤマハンノキの空間的相互作用	78
2. 3. 4	考察	79
第3章 ケヤマハンノキの根粒形成、光合成特性、成長に及ぼす高 CO₂ と窒素供給量の影響		88
3. 1	成長と根粒形成に及ぼす高 CO ₂ と窒素供給量の影響	88
3. 1. 1	背景	88
3. 1. 2	材料と方法	89
3. 1. 2. 1	対象樹種	89
3. 1. 2. 2	実験設定	89
3. 1. 2. 3	各器官のバイオマスと窒素含量	90
3. 1. 2. 4	根粒のニトロゲナーゼ活性と推定窒素固定量	90
3. 1. 2. 5	統計解析	91

3. 1. 3	結果	91
3. 1. 3. 1	樹木個体と根粒のバイオマス	91
3. 1. 3. 2	バイオマス配分	91
3. 1. 3. 3	樹木個体の窒素含量	91
3. 1. 3. 4	根粒のニトロゲナーゼ活性と推定窒素固定量	92
3. 1. 4	考察	92
3. 1. 4. 1	根粒形成	92
3. 1. 4. 2	窒素供給量による根粒形成の抑制	92
3. 1. 4. 3	窒素固定量	92
3. 2	光合成特性に及ぼす高 CO ₂ と窒素供給量の影響：ミズナラ、イタヤカエデとの比較	96
3. 2. 1	背景	96
3. 2. 2	材料と方法	97
3. 2. 2. 1	材料と実験設定	97
3. 2. 2. 2	開葉速度	97
3. 2. 2. 3	光合成特性	98
3. 2. 2. 4	葉内の窒素配分の間接的評価	99
3. 2. 2. 5	成熟葉の性質	100
3. 2. 2. 6	各器官のバイオマス配分と窒素含量	100
3. 2. 2. 7	統計解析	100
3. 2. 3	結果	101
3. 2. 3. 1	開葉速度	101
3. 2. 3. 2	光合成特性	101
3. 2. 3. 3	水分特性と気孔反応	102
3. 2. 3. 4	成熟葉の性質	102
3. 2. 3. 5	成熟葉の窒素含量と光合成特性の関係	103
3. 2. 3. 6	成熟葉内の窒素配分	103
3. 2. 3. 7	成熟葉の TNC 含量	104
3. 2. 3. 8	成長とバイオマス配分	104
3. 2. 4	考察	104

3. 2. 4. 1	葉齢と光合成反応	……104
3. 2. 4. 2	成長反応と光合成反応	……106
3. 2. 4. 3	葉内の窒素配分	……106
3. 2. 4. 4	光合成の窒素利用効率の変化	……108
3. 2. 4. 5	成熟葉の性質の変化	……108
3. 2. 4. 6	ポット試験の結果の解釈	……109
3. 2. 4. 7	まとめ	……109
3. 3	ケヤマハンノキにおける落葉時の窒素再吸収効率に及ぼす高 CO ₂ と窒素供給量の影響— ミズナラ、イタヤカエデとの比較—	……126
3. 3. 1	背景	……126
3. 3. 2	材料と方法	……127
3. 3. 2. 1	落葉時の窒素再吸収効率	……127
3. 3. 2. 2	統計解析	……128
3. 3. 3	結果	……128
3. 3. 3. 1	落葉の窒素含量	……128
3. 3. 3. 2	窒素再吸収効率	……129
3. 3. 3. 3	落葉中の窒素含有量	……129
3. 3. 4	考察	……129
3. 3. 4. 1	落葉の窒素濃度	……129
3. 3. 4. 2	窒素再吸収効率	……130
3. 3. 4. 3	LMA と葉内窒素配分	……130
3. 3. 4. 4	落葉による土壌への窒素供給量	……132
3. 3. 4. 5	窒素再吸収効率の評価手法	……133
3. 3. 4. 6	まとめ	……134
第4章	ケヤマハンノキの成長、根粒形成、光合成特性に及ぼす高 CO ₂ とリン酸供給量と土壌乾燥 の影響—ミヤマハンノキとの比較—	……138
4. 1	背景	……138
4. 2	材料と実験設定	……139

4. 2. 1	対象樹種	……139
4. 2. 2	高 CO ₂ 、土壌リン酸供給量、土壌乾燥処理	……140
4. 2. 3	根粒のニトロゲナーゼ活性	……141
4. 2. 4	成長とバイオマス配分	……141
4. 2. 5	葉の窒素とリン含有量	……142
4. 2. 6	光合成特性	……142
4. 2. 7	統計解析	……142
4. 3	結果	……143
4. 3. 1	根粒のニトロゲナーゼ活性	……143
4. 3. 2	根粒バイオマス	……143
4. 3. 3	樹体バイオマス	……143
4. 3. 4	バイオマス配分	……144
4. 3. 5	葉の窒素とリン含有量	……144
4. 3. 6	光合成特性	……145
4. 4	考察	……145
4. 4. 1	ニトロゲナーゼ活性と根粒バイオマス	……146
4. 4. 2	リン酸供給量不足の影響	……146
4. 4. 3	根粒形成に対する土壌乾燥の影響	……147
4. 4. 4	高 CO ₂ に対する光合成反応	……149
4. 4. 5	乾燥土壌に対する光合成の順化反応	……149
4. 4. 6	ニトロゲナーゼ活性	……150
4. 4. 7	外生菌根菌とフランキアとハンノキ属樹種間の三者共生関係	……150
4. 4. 8	まとめ	……151
第5章	総合考察	……157
5. 1	ケヤマハンノキ天然更新林分での窒素固定量の推定	……157
5. 1. 1	推定窒素固定量と林分内窒素循環における寄与	……158
5. 1. 2	ニトロゲナーゼ活性の推定方法	……159
5. 1. 3	根粒バイオマスの推定方法	……160

5. 1. 4	根粒の分布様式	……161
5. 1. 5	窒素固定量の推定方法	……161
5. 1. 6	植生遷移への寄与	……162
5. 2	高 CO ₂ に対するケヤマハンノキの光合成・成長反応に及ぼす土壤条件の影響	……163
5. 2. 1	リン酸供給量が充分ある土壤での光合成反応	……164
5. 2. 2	窒素固定能を持たない樹種の光合成反応	……165
5. 2. 3	リン酸供給量が不足する土壤での光合成反応	……166
5. 2. 4	リン酸供給量が不足する土壤での水分条件の影響	……167
5. 2. 5	高 CO ₂ 環境でのリン酸要求量	……168
5. 2. 6	高 CO ₂ 環境での相対成長関係	……169
5. 2. 7	高 CO ₂ 環境での根粒形成	……169
5. 2. 8	高 CO ₂ 環境での窒素固定量	……171
5. 2. 9	樹体内の窒素配分とバイオマス配分の高 CO ₂ 応答	……172
5. 2. 10	落葉の窒素含有量に対する高 CO ₂ の影響	……173
5. 2. 11	高 CO ₂ 応答のまとめ	……173
第6章	総括	……182
6. 1	リン酸供給量が充分ある場合のケヤマハンノキの光合成反応	……183
6. 2	窒素固定能力の有無による高 CO ₂ に対する光合成応答の違い	……184
6. 3	リン酸供給量不足に対するケヤマハンノキの光合成応答	……185
6. 4	土壤乾燥に対するケヤマハンノキの光合成順化反応による補償効果	……185
6. 5	ケヤマハンノキの光合成反応が生態系へ及ぼす影響	……186
6. 6	まとめ	……187
	謝辞	……188
	引用文献	……191
	要旨	……217

第1章

序論

共生的生物窒素固定は、森林生態系における窒素 (N) 循環の主要な一収入経路である。温帯から冷温帯における森林生態系の窒素循環では、放線菌の1種のフランキア (*Frankia*) と共生して大気中の窒素を固定する共生的生物窒素固定能力を持つ植物、アクチノリザル植物 (*actinorhizal plants*)、中でも広範な分布域を示すハンノキ属樹種が、重要な役目を果たしている (Tjepkema et al. 1986; Baker and Schwintzer 1990; Huss-Danell 1997; Pawlowski and Newton 2008)。ハンノキ属樹種はその窒素固定能力により、荒廃地の緑化や攪乱を受けた窒素不足の立地の改善に利用されている (Zitzer and Dawson 1992; Enoki et al. 1997; Sharma et al. 2002; Yamanaka et al. 2005; Son et al. 2007)。ただし、林分規模での、特に天然更新林分での窒素固定量のデータは不足している。特に、日本ではハンノキ属樹種の材の利用がほとんどないため、ハンノキ属樹種の人工林が少なく、天然更新林分が大部分を占める。しかも河川の氾濫源や林道工事跡地の列状の林分も多く含まれる。海外で報告されているハンノキ属樹種の林分規模の窒素固定量は人工林を対象としたものが多いため (Sharma et al. 2002; Lee and Son 2005; Son et al. 2007)、人工林との違いを考慮した天然更新林分での窒素固定量の評価が必要とされる。

また、近年の大気中の二酸化炭素 (CO_2) 濃度の上昇の問題に対しても、 CO_2 濃度が上昇すると相対的に窒素への要求が高まるため、ハンノキ属樹種のような共生的生物窒素固定能力を持つ樹種 (窒素固定樹種) は、将来予測される窒素不足を補う生態系への窒素供給源としての役割を演ずるものとして注目されている (Norby 1987; Houghton et al. 2001; Hungate et al. 2003; Koike et al. 2006)。ただし、窒素固定の過程では宿主樹木から供給される光合成生産物をエネルギーとして利用するため、光合成に影響を及ぼす要因が窒素固定活性を左右する。そのため、大気 CO_2 濃度の上昇に対する窒素固定樹種の生理的反応や成長反応に関して、土壌条件等の複合影響を考慮する必要がある。

光合成生産物を利用する場所をシンク、光合成生産物を供給する場所をソースと考えた場合に、植物体内のシンク・ソースバランスの変化は、葉の光合成能力を制御する重要な要因の一つとなる (Kasai 2008)。大気 CO_2 濃度の上昇に対する光合成反応でもシンク不足や窒素供給量不足により光合成能力が低下することが多数報告されている (光合成のダウンレギュレーションと呼ぶ; Long et al. 2004; Nowak et al. 2004; Ainsworth and Long 2005; Rogers and Ainsworth 2006)。根粒形成と根粒で窒素

固定を行うためには多くの光合成生産物の供給が必要となるため、窒素固定樹種の根粒は光合成生産物のシンクと考えることができる (Pizelle 1984; Chapin et al. 2002)。つまり、窒素固定樹種は「シンク能を高く維持することのできる樹種」と見なすことができ、窒素固定能力を持つため、土壌中の窒素供給量が不足する立地でも光合成反応における「シンクリミット」を回避することができると考えられる。そのため、窒素固定樹種の光合成・成長反応は、窒素固定能を持たない樹種の反応と異なることが予想される。

本研究の前半部分では、林道工事時の土壌攪乱後に天然更新したハンノキ属のケヤマハンノキの林分で窒素固定量の推定を行った。林分内の窒素移動量に対する窒素固定能力の寄与を明らかにし、窒素固定により大気中から吸収された窒素が速やかに林床土壌へ供給され立地の肥沃化に貢献していることを評価することを目的とした。本研究の後半部分では、ケヤマハンノキを窒素固定樹種のモデルケースとして、ポット植栽苗木を用いた環境制御実験を行い、生育環境の資源量の変化に対する光合成・成長の反応を調べた。特に、大気中の CO₂ 濃度上昇時の光合成のダウンレギュレーションを回避するメカニズムを、資源制約を受けたときの反応を元に解明することを目的とした。一連の研究を通じて、窒素固定能を持つハンノキ属樹種のケヤマハンノキを、「シンク能を高く維持することのできる樹種」としてとらえ、窒素固定能を持つケヤマハンノキの生育環境の変化に対する生理的応答のメカニズムの特殊性を探り、その反応が生態系に及ぼす影響の理解を深める。

第1章では、まず、森林生態系における窒素固定の位置付け (1. 1) とハンノキ属が属するアクチノリザル植物について紹介し (1. 2)、次に、森林生態系におけるハンノキ属樹種の共生的生物窒素固定の評価 (1. 3)、生育環境の資源量の変化に対するハンノキ属樹種の光合成応答 (1. 4) について、それぞれの背景を紹介する。最後に本論文の目的と構成 (1. 5) を示して序論とする。

1. 1 森林生態系の窒素循環における窒素固定の役割

窒素は三主要養分元素の一つで、植物が最も多量に必要とする元素である。森林生態系においてリンや他のほとんどの無機養分は土壌の発達の初期段階における母岩鉱物の風化により系内に供給されるが、窒素は母岩の風化由来の供給はなく、大部分が微生物による窒素固定と降下粉塵や降水に由来している。そのため、共生的生物窒素固定は窒素の収入経路の一つとして重要な位置を占めている。樹木に吸収された窒素は樹体に集積保持され、その一部はリターとして林床土壌へ供給される。林床では、窒素は有機物として土壌に集積し、時間をかけて土壌生物によって無機化され再び植物に吸収される。森林生態系から窒素が系外へ移動する経路は、水にとまらう流出や脱窒によ

る系外への支出の経路がある。発達した森林生態系では、系外の窒素移動量に比べ、系内で循環させている窒素量が多く、森林生態系内の植物—土壤—土壤微生物の間で 90% 以上の窒素を循環させるような高度に発達した内部循環機構を発達させている (Tsutsumi 1989; Iwatsubo 1996; Chapin III et al. 2002; Koike 2004)。

森林生態系において土壤の窒素供給量不足による植物の成長の制限は広範に存在するため (Vitousek and Howarth 1991)、植物群集の形成や生態系機能に対する生物窒素固定の役目は大きい (Chapin et al. 1994; Thomas and Bowman 1998)。特に、火山噴火跡地や、氷河退行跡地、土石流跡地のような、土壤の発達の初期段階には、土壤養分の中でも窒素供給量が多いの温帯域の森林生態系の植物の成長を制限する最も重要な要素となる (Vitousek and Walker 1987; Vitousek and Howarth 1991)。窒素固定樹種は、貧栄養な土壤に林分を形成し、窒素固定により獲得した窒素を土壤へ供給することで土壤の養分状態の改善の役目を果たす (Huss-Danell et al. 1992; van Cleve et al. 1993; Wurtz 1995; Rhoades et al. 2001; Myrold and Huss-Danell 2003; Sharma et al. 2009)。また、窒素固定樹種による土壤への窒素供給により、人工林で窒素固定樹種と混植された針葉樹の成長量増加が生じるという補償効果 (Brockley and Sanborn 2003) に加えて、林床植生の多様性を高める効果があることも報告されている (Hanley et al. 2006)。

1. 2 アクチノリザル植物とフランキアの共生的生物窒素固定

ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) は、ハンノキ属のハンノキ亜属 (*Gymnothyrsus*) に属す高木樹種である。根系に放線菌のフランキアの感染により根粒を形成し、この根粒において大気中の窒素を吸収する共生的生物窒素固定を行うことができる。宿主植物のケヤマハンノキが光合成生産物を根粒中のフランキアへ供給し、フランキアは大気中から固定した窒素を宿主植物に供給するという共生関係を結んでいる。このケヤマハンノキのようにフランキアと共生して窒素固定を行うことのできる植物を総称してアクチノリザル植物と呼ぶ。アクチノリザル植物は、8 科 25 属にわたり 280 種以上存在する (Baker and Schwintzer 1990; Pawlowski and Newton 2008)。全て多年生の双子葉植物で、草本性の *Datisca* を除いて、木本の低木または高木種である (Tjepkema et al. 1986)。共生的生物窒素固定では、マメ科植物 (*Legume spp.*) と細菌のリゾビウム (*Rhizobium*) の関係がよく知られているが、アクチノリザル植物とフランキアの関係は、マメ科植物とリゾビウムとの関係と異なる点がある。その一つが分布域で、マメ科植物はその多くが熱帯域に分布しているのに対し、アクチノリザル植物は、その多くが温帯から寒帯域に分布している。しかも、マメ科植物は、熱帯地域では木

本種も多く含むものの、温帯域では木本が少なく草本が圧倒的に多いのに対し、アクチノリザル植物はほとんどが木本種である。そのため、温帯から寒帯域では、アクチノリザル植物が森林生態系における窒素固定の大きな部分に寄与していると考えられている (Dawson 1983; Tjepkema et al. 1986; Dawson 2008; Pawlowski and Newton 2008)。

日本にはハンノキ属 (*Alnus*)、ヤマモモ属 (*Myrica*)、グミ属 (*Elaeagnus*)、モクマオウ属 (*Casuarina*)、ドクウツギ属 (*Coriana*) などの樹種が自生している。アクチノリザル植物の中で最も広範に分布し、代表的な樹種がハンノキ属樹種である (Dawson 2008)。ハンノキ属樹種には高木種から低木種まで全世界で 47 種あり、いずれも温帯から寒帯域に広範囲に分布し、その全種で根粒を形成することが確認されている (Bond 1983; Torrey and Berg 1988; Baker and Schwintzer 1990; Pawlowski and Newton 2008)。これらハンノキ属樹種の起源の中心は、種数の多さと固有種の多さから北東アジアだろうと考えられている (Murai 1964; Navarro et al. 2003)。日本にはハンノキ属の樹種が 16 種分布している (Uemura and Sato 1975)。ハンノキ亜属 (*Gymnothyrsus*) とミヤマハンノキ亜属 (*Alnaster*) の 2 亜属がある (Somego 1985)。ハンノキ属の中でもケヤマハンノキは北海道から本州、さらには東アジアまで広範囲に分布している樹種である (Murai 1968)。

根粒の形態もマメ科植物とアクチノリザル植物では異なる。マメ科植物にリゾビウムが感染し形成される根粒は単年生で根の形態を残していないのに対し、アクチノリザル植物にフランキアが感染し形成される根粒は多年生で珊瑚状の分岐した形を示し、しかも根としての形態を残し、根粒の中心に維管束を持つ (Pawlowski and Newton 2008)。

1. 3 天然更新林分での窒素固定能力の把握

フランキアとハンノキ属樹種の共生的生物窒素固定量は、リゾビウムとマメ科植物の窒素固定量と同程度であることが報告されているが (Hibbs and Cromack 1990; Huss-Danell 1990; Hurd and Schwintzer 1996; Hurd et al. 2001; Samborn et al. 2002; Sharma et al. 2002; Lee and Son 2005; Son et al. 2007)、自然状態の森林における窒素固定量や窒素固定の生態学的制御要因の両方についてデータが不足している (Vitousek et al. 2002; Dawson 2008)。多くのハンノキ属樹種が生育する日本でも、ハンノキ属樹種の窒素固定に関する研究は少なく (Tsutsumi et al. 1993; Yamanaka et al. 2003, 2005)、特に、成木の林分レベルでの窒素固定量の推定の研究が不足している。

北方の温帯林に分布するアクチノリザル植物は主に落葉広葉樹であり、根に感染したフランキアが根粒を形成し窒素固定を行うためには宿主植物からの十分な光合成生産物の供給が必要であるた

め、根粒のニトロゲナーゼ活性（フランキアのもつ、窒素分子をアンモニアに変換する窒素固定酵素ニトロゲナーゼの活性：便宜的に窒素固定活性と呼ぶ場合もある）は樹木のフェノロジーに併せて大きな季節変動を示す (Schwintzer et al. 1982; Huss-Danell 1990; Tsutsumi et al. 1993)。

ハンノキ属樹種の根粒はフランキアが側根に感染して形成され (Baker and Schwintzer 1990; Huss-Danell 1997)、多年生であり成長するため、同一樹木個体内に様々なサイズの根粒が存在する (Akkermans and van Dijk 1976 ; Baker and Schwintzer 1990; Huss-Danell 1997)。根粒は齢に伴うサイズの増加と共に窒素固定を行わない部分の割合が増加するため、根粒のサイズは単位根粒重量当たりのニトロゲナーゼ活性に影響を及ぼす (Sharma and Ambasht 1984; Huss-Danell 1990; Hurd et al. 2001)。

本研究では、根粒のニトロゲナーゼ活性の季節変化を明らかにするために現在広く用いられているアセチレン還元法を用いた (Hardy et al. 1968, 1973)。アセチレン還元法では単位根粒重量当たりのニトロゲナーゼ活性を測定する。そのため、樹木1個体当たり、または単位土地面積当たりの窒素固定量を評価するためには、1個体、または単位面積当たりの根粒バイオマスの推定が必要となる。

人工林におけるハンノキ属樹種の根粒の水平分布や根粒バイオマスは林齢や樹木個体サイズ、立木密度などに依存して変動することが報告されている (Bormann and Gordon 1984; Sharma and Ambasht 1986; Son et al. 2007)。例えば、根粒の水平分布は林齢により空間変動の大きさが異なり、若齢林分ほど幹の近くに根粒が集中的に分布し、林齢の増加と共に根粒の水平分布がより均一になることが示されている (Rytter 1989)。また、ハンノキ属樹種の人工林において、林齢の増加に伴い、樹木の窒素要求量、根粒のニトロゲナーゼ活性や樹木個体あたりの窒素固定量、林分内の窒素循環における窒素固定量の寄与率が変化することが報告されている (Sharma and Ambasht 1988 ; Sharma et al. 2002 ; Son et al. 2007)。

人工林と異なり、河川の氾濫源や道路脇のような土壌が攪乱を受けた後などに天然更新した林分では、樹木の分布や樹木個体のサイズが均一でなく変動が大きいことが予想される。このような天然更新林分では、樹木個体サイズの変動を反映して、根粒のニトロゲナーゼ活性や根粒の水平分布の変動が大きい可能性がある。さらに、樹木個体サイズの違いにより根粒のサイズ構造が変動する場合、樹木個体あたりや林分あたりの窒素固定量の推定に影響を及ぼすことが予想される。

アクチノリザル植物の窒素固定能力が生態系に及ぼす影響として、土壌の肥沃化に加えて、林床植生の多様性を高める効果も報告されている (Hanley et al. 2006)。植物は固着性のため、更新個体の初期の空間分布と個体群の空間構造が母樹の位置と種子散布能力に大きく左右される (Armest et al. 1991; Houle 1992; Nanami 1999)。土壌の攪乱を受けた立地では、林分発達の初期段階に侵入する樹種

以外の樹種の母樹は存在しないことが予想される。ハンノキ属樹種の人工林では、土壌の肥沃化に伴い鳥の餌となる土壌動物の量が増加し、ユーカリやマツの人工林に比べて鳥類の多様性が高くなったことが報告されている (Carlson and Dawson 1985)。攪乱を受けた立地に天然更新したハンノキ属樹種は鳥の止まり木として利用され、鳥散布型の種子に対する母樹としての役割を演じる可能性があり、ハンノキ属樹種の存在が更新植物の分布様式にも影響を及ぼすことも考えられる。

1. 4 生育環境の資源量変化に対する光合成・成長応答

1. 4. 1 窒素固定樹種の窒素固定能力と光合成能力の間のフィードバック

フランキアが根粒で窒素固定を行うためには宿主植物からの十分な光合成生産物の供給が必要であり、宿主植物の葉から根粒へ配分される光合成生産物量の変化に対してニトロゲナーゼ活性は敏感に変動する (Wheeler 1971; Huss-Danell 1997; Valverde and Wall 2003)。そのため、ニトロゲナーゼ活性は、樹木の光合成活性に影響を及ぼす、さまざまな非生物的環境要因により変動する (Huss-Danell 1990; Pawlowski and Newton 2008)。葉の窒素の大部分が光合成機能に利用されているため、光合成能力は葉の窒素含量と密接な正の相関関係を示す (Evans 1989)。そのため、光合成能力は、葉の窒素含量を左右する土壌の窒素栄養条件に大きく影響を受ける。窒素固定による窒素の吸収も窒素供給源となるため、窒素固定能力も葉の窒素含量にプラスの影響を及ぼす。窒素固定樹種と根粒中のフランキア間の共生関係は、「宿主植物の光合成による光合成生産物とフランキアの窒素固定による窒素化合物のやりとり」というだけでなく、「窒素固定能力と光合成能力が相互に影響を及ぼし合う関係」とみなすことができると考える。「窒素固定を行うことで、葉の窒素含量を高め、光合成能力を上昇させることができる。さらに、光合成能力の上昇により宿主植物の樹体の成長量が増加し、それと共に、根粒形成が促進され、窒素固定能力が上昇する」という一連の流れが生じることが考えられる。本研究では、この関係を「窒素固定能力と光合成能力の間のフィードバック」と考える。

1. 4. 2 光合成能力のシンク・ソースバランス制御

光合成生産物を利用する場所をシンク、光合成生産物を供給する場所をソースと考えた場合に、植物体内のシンク・ソースバランスの変化は、葉内の炭水化物（糖類）蓄積を通じて葉の光合成を制御する重要な要因の一つとなる (Kasai 2008)。窒素固定能を持たない樹種の場合、土壌の窒素供給量不足も葉の窒素含量の低下により光合成能力を低下させるが、光合成生産量の減少に伴う成長量

の低下によるシンク能の低下（シンクリミット）という間接的な影響により光合成能力の低下に繋がると考えられる。従って、この土壌中の窒素不足による成長量の低下もシンクリミットの一因となると考えられる。つまり、「シンクリミット」と「窒素リミット」の両方が光合成能力の低下に影響を及ぼす要因になると考えることができる。

根粒形成と根粒で窒素固定を行うために必要な光合成生産物の供給量は、土壌中の窒素を吸収する際に必要なエネルギーよりも2倍から4倍も大きい（Chapin et al. 2002）、窒素固定樹種の根粒は、根や発達中の葉、果実などと光合成生産物を巡って競争する“シンク”と見なされる（Hall et al. 1979; Huss-Danell and Sellstedt 1983; Pizelle 1984）。そのため、窒素固定樹種は、「シンク能を高く維持することのできる樹種」と見なされ、他の環境条件に制限がない場合、土壌中の窒素供給量が不足する立地でも、光合成反応における「窒素リミット」と「シンクリミット」の両方の要因を回避することができると考えられる。以上より、生育環境の資源量の変動に対する、「シンク能の高い」窒素固定樹種の光合成・成長反応は、窒素固定能を持たない樹種の反応と異なることが予想される。

1. 4. 3 CO₂ 濃度上昇に対する光合成反応

樹木の生育環境の変化の一つとして、光合成の基質である大気中の CO₂ 濃度の上昇が問題となっており（IPCC 2007）、高い CO₂ 濃度（高 CO₂）環境下での樹木の光合成反応・成長反応を明らかにすることが求められている。理論的な光合成の生化学モデル（Farquhar et al. 1980）に基づく CO₂ 濃度の上昇に対する短期的な応答では、現在の大気中の CO₂ 濃度の上昇に伴い光合成速度が上昇することが予想される。一般的に、CO₂ 濃度の上昇に対する長期的な応答でも、養分や水分、光などの資源が樹木の生産性を制限しない場合、CO₂ 濃度の上昇により個葉の光合成速度が上昇し、樹木の成長は促進される（Norby et al. 1999; Körner 2006）。しかし、実際に樹木を高 CO₂ 条件下で長期間生育させた場合、生育環境の高 CO₂ 条件下で測定した光合成速度が理論的な予測値より低下するケースが多くみられる（Long et al. 2004; Nowak et al. 2004; Ainsworth and Long 2005; Rogers and Ainsworth 2006）。この光合成能力が低下する現象は光合成のダウンレギュレーションと呼ばれる。高 CO₂ 下で光合成のダウンレギュレーションが生じる原因の一つに、先述した光合成生産物の生産量（ソース能）に対して利用する量（シンク能）が不足し、葉内に余剰の炭水化物が蓄積することが考えられる（Stitt and Krapp 1999; Long et al. 2004; Ainsworth and Long 2005; Ainsworth and Rogers 2007）。葉の発達段階などは、シンク・ソースバランスを通じて、高 CO₂ に対する光合成の順化反応に影響を及ぼす（Nie et al. 1995a, 1995b; Reekie 1996; Miller et al. 1997; Osborne 1998; Wait et al. 1999; Adam et al. 2000; Kauter et al. 2000;

Lewis et al. 2002; Bernacchi et al. 2005; Davey et al. 2006, Rogers and Ainsworth 2006)。固定成長のような遺伝的な開葉の制限により光合成のダウンレギュレーション反応が加速された例もあり (Ainsworth et al. 2004; Long et al. 2004)、葉の発達段階と関連の深い樹種間の開葉様式の違い (Kikuzawa 1983) もシンク・ソースバランスを左右し、高 CO₂ に対する光合成反応に影響を及ぼすことが予想される。

また、土壌中の窒素供給量不足も成長抑制によるシンクリミットの一つの原因であり、高 CO₂ 下での光合成のダウンレギュレーションを引き起こす (Rogers et al. 1998; Adam 2000; Ainsworth and Rogers 2007)。森林生態系では窒素が充分ある場合が少ない (Vitousek and Howarth 1991)。その上、高 CO₂ 下で樹木の成長量が増加した場合、その成長量を維持するための養分要求量が増大する可能性が高い。その結果として、高 CO₂ 下では窒素が徐々に不足し、高 CO₂ 下での樹木の成長量の増加が抑制されると予想されている (Luo et al. 2004)。この仮説は窒素制限仮説 (Progressive Nitrogen Limitation (PNL) 仮説) と呼ばれており、現在でも世界各地で後述する開放型 CO₂ 付加実験 (Free Air CO₂ Enrichment; FACE) により検証研究が進められている (Hungate 2006; Norby and Iversen 2006)。現時点では、高 CO₂ 下で樹木の成長促進を維持するためには森林生態系外からの窒素の追加供給が必要と考えられている (Johnson 2006; Reich et al. 2006)。以上のような理由から、窒素固定樹種の高 CO₂ に対する反応は将来の高 CO₂ 環境での窒素供給という観点から重要視されている (Houghton et al. 2001)。窒素供給量の不足する土壌でも高 CO₂ 条件下で窒素固定樹種の成長が促進されるなどの研究例が報告されている (Temperton et al. 2003; Watanebe et al. 2008)。高 CO₂ 下で窒素固定樹種による窒素固定量が増加し、葉リター等による窒素供給量を通じて土壌の窒素供給量を増加させることにより、窒素固定能を持たない他の植物の高 CO₂ に対する成長反応が改善されることが期待されている (Norby 1987; Hartwig et al. 1996)。

1. 4. 4 窒素固定樹種の CO₂ 濃度上昇に対する応答

「シンク能の高い」窒素固定樹種は土壌窒素に対する依存度が低いいため、高 CO₂ に対する光合成反応において、窒素固定能を持たない樹種と異なり、「窒素リミット」と「シンクリミット」を受けず、光合成のダウンレギュレーションを回避することができることが予想される。高 CO₂ に対する樹木の光合成の順化は葉の窒素含量の低下や葉内の窒素配分の変化と関連している (Ceulemans and Mousseau 1994; Ceulemans et al. 1999; Medlyn 1999; Norby 1999; Temperton 2003)。理論的な光合成の生化学モデル (Farquhar et al. 1980) に基づく最も効率的な窒素配分 (最適窒素配分と呼ぶ) では、CO₂ 濃度が通常の 2 倍に上昇するような場合、炭酸同化系のルビスコへの配分を減らし、電子伝達

系に関連する酵素 (Rogers 1999; Harrison 2001) に窒素を配分するほうが有利と考えられ、光合成速度と葉内間隙の二酸化炭素濃度の関係 ($A - C_i$ 関係) において最大炭酸同化速度 (V_{cmax}) が低下し、最大電子伝達速度 (J_{max}) が上昇することが予想される (Drake et al. 1997; Makino et al. 1997; Hikosaka and Hirose 1998; Long et al. 2004)。しかし、実際に高 CO_2 環境で生育した場合に、このような理論的に予想された反応を示す例はほとんどない (Medlyn et al. 1999)。「シンク能の高い」窒素固定樹種では、高 CO_2 に対して最適窒素配分に近い反応を示すことができるかもしれない。

一方、窒素固定樹種の窒素固定能力を過大評価している可能性も指摘されている (Hungate et al. 2003)。ハンノキ属樹種の根粒での窒素固定には光合成生産物の供給を必要とするため、ハンノキ属樹種の窒素固定量は光合成活性に影響を及ぼす環境要因に左右される (Hungate et al. 2003; Dawson 2008)。高 CO_2 に対するハンノキ属樹種の応答を解明する場合、高 CO_2 と CO_2 濃度以外の環境要因との複合効果を考慮する必要がある。特に、土壌の養分供給量の影響は、高 CO_2 に対する樹木の反応に関する未解明の部分が残されている重要な問題である (McCarthy et al. 2010)。本研究では、土壌養分として窒素供給量とリン酸供給量、養分以外の要因として土壌乾燥を要因として注目した。次にそれぞれの要因を考慮する背景を説明する。

1. 4. 5 土壌窒素供給量の影響

窒素供給量では、供給量が多いことによる根粒形成の抑制が問題となる。通常の CO_2 濃度条件下では、土壌中の無機態窒素供給量が充分ある場合、根粒形成や根粒のニトロゲナーゼ活性が抑制される (Ekblad and Huss-Danell 1995; Sasakawa 1995; Koike et al. 1997; Vogel et al. 1997; Zanetti et al. 1998)。これは宿主である樹木側が根粒形成量を抑制し、土壌中の窒素の吸収割合を増加させる機構をもつことによることが近年明らかになってきた (Wall and Berry 2008)。根粒形成と根粒で窒素固定を行うために必要な光合成生産物の供給量は、土壌中の窒素を吸収する際に必要なエネルギーよりも数倍も大きい (Chapin et al. 2002)、土壌中の窒素供給量が多い場合、窒素吸収源の変化に伴い、窒素固定に投資していたエネルギーコストが減少し、光合成反応に変化を及ぼす可能性も考えられる。

また、高 CO_2 環境下では光合成の基質となる CO_2 濃度が高いため、ハンノキ属樹種の光合成速度が高まり、根粒への光合成生産物の配分が増加する可能性がある (Norby 1987; Vogel et al. 1997)。その結果、通常の CO_2 濃度条件下で見られる土壌の窒素供給量の増加による根粒形成や窒素固定活性の抑制が、高 CO_2 下で緩和される可能性も考えられる (Thomas et al. 2000)。もしそうであれば、高 CO_2 下で窒素固定樹種が吸収した窒素に占める窒素固定由来の窒素の占める割合が高い期間が現状

より長く継続し、その結果、窒素固定による生態系外からの窒素の収入が増加する可能性がある。

1. 4. 6 土壌リン酸供給量の影響

次にリン酸供給量については、供給量不足が問題となる。多くの研究が窒素供給量に焦点を当てているが (Reich et al. 2006)、リン (P) 制限も多くの陸域生態系で共通にみられる現象であると考えられる (Nord and Lynch 2009)。共生的生物窒素固定には多量のリンが利用されるため、窒素固定樹種は他の窒素固定能を持たない樹種に比べてリンの要求度が高い (Huss-Danell 1997; Uliassi and Ruess 2002; Valverde et al. 2002; Gentili and Huss-Danell 2003; Edwards et al. 2006; Dawson 2008)。そのため、土壌のリン酸供給量の不足は、通常の CO₂ 濃度条件でも窒素固定樹種の根粒形成や窒素固定活性を抑制する要因の一つとなる (Gentili and Huss-Danell 2003; Edwards et al. 2006)。土壌中のリン酸供給量の不足が、1. 根粒形成の抑制、2. 宿主植物の成長の抑制、の2つの過程でアクチノリザル植物の窒素固定に対して影響を及ぼすことが近年明らかにされてきた (Wall and Berry 2008)。また、窒素固定能を持たない樹種では、リン要求度が高 CO₂ 環境下で増加する傾向を示した研究例が報告されている (Kogawara et al. 2006; Lewis et al. 2010)。窒素固定樹種は通常の CO₂ 濃度環境下でもリン要求度が高いため、高 CO₂ 下でリン酸制限を受けやすい可能性が考えられる。さらに、将来、大気からの酸性降下物の増加に伴い (Vitousek et al. 1997; Hyvönen et al. 2007; Wallace et al. 2007)、土壌中の養分バランスが崩れ、土壌中のリン酸供給量が制限される可能性も考えられている (Wassen et al. 2005; Gress et al. 2007)。

1. 4. 7 土壌水分条件の影響

土壌養分以外の要因として、土壌の乾燥の影響が問題となる。土壌の乾燥は、気孔開度の低下を通じて光合成速度を低下させ、樹木の成長量を制限する (Flexas and Medrano 2002)。養分リミットの場合と異なり、可逆的な反応で、灌水により気孔が開き、光合成速度が上昇する。生物窒素固定には光合成生産物の供給をエネルギーとして必要とするため、土壌乾燥に対する光合成反応は根粒形成や窒素固定にも影響を及ぼす (Sharma et al. 2010)。

植物が適度な乾燥条件で長期間生育した場合、葉内間隙 CO₂ 濃度 (C_i) が低い範囲 (ルビスコ活性律速の範囲) の光合成能力を示す最大炭酸固定速度 (V_{cmax}) が乾燥条件下で上昇することがある (Qaderi et al. 2006; Kitao et al. 2007)。この反応を乾燥ストレスに対する光合成の順化反応と呼んでいる。多くの植物が高 CO₂ 下で光合成のダウンレギュレーションを示すが (Long et al. 2004; Nowak et al.

2004; Ainsworth and Rogers 2007)、緩やかな長期間の乾燥に対する光合成の順化反応でみられる V_{cmax} の上昇は、高 CO_2 に対する光合成のダウンレギュレーションによる V_{cmax} の低下と逆向きの反応となる。そのため、高 CO_2 による光合成に対する効果が土壤乾燥条件により緩和される可能性が示唆されている (Qaderi et al. 2006; Kitao et al. 2007)。ただし、このような乾燥に対する光合成の順化反応が、樹種や養分条件に関わらず生じるのかどうかは明らかになっていない。特に、土壤水分条件と土壤養分条件の複合効果に対する樹木の反応に対する知見は不足している (Lewis et al. 2010)。さらに、将来、 CO_2 濃度上昇に伴う気温上昇により夏期の降雨量が減少することが予想されている (Naumburg et al. 2004; GeBler et al. 2007; IPCC 2007; ESF-Forest FACE Group et al. 2010)。以上のことから、高 CO_2 と、土壤リン酸供給量不足、土壤乾燥という複合効果に対するハンノキ属樹木の生理的応答を明らかにする必要がある。

1. 4. 8 樹木個体レベルの CO_2 濃度上昇に対する応答

高 CO_2 に対する樹木の個体レベルの成長反応は、成長速度に対する影響や、バイオマス配分の変化、個体重量と各器官重量の間の相対成長関係の変化などにより生じる (Lewis et al. 2010)。高 CO_2 下で、樹木個体の成長量の増加や窒素固定量の増加が報告されているが、窒素固定量の増加の原因については、樹木個体あたりの根粒バイオマスの増加や根粒の単位重量当たりの活性の上昇など、実験によりさまざまである (Norby 1987; Arnone and Gordon 1990; Schortemeyer et al. 1999; Thomas et al. 2000; Watanabe et al. 2008)。また高 CO_2 下での根粒バイオマスの増加についても、根粒へのバイオマス配分が増加したのか、樹木個体の成長量の増加に伴った根粒バイオマスの増加なのか、統一した見解は示されていない。

また、樹木の各器官の窒素濃度は高 CO_2 下で変化する場合があり、一般的に葉の窒素濃度は高 CO_2 下で低下する (Ainsworth and Rogers 2007)。高 CO_2 に対する窒素濃度の反応は樹木の各器官の間で同じとは限らないため、生育環境条件によって高 CO_2 に対する樹体内の窒素配分の反応がバイオマス配分の反応と異なる場合が生じる可能性が考えられる。樹木の成長に対する高 CO_2 や、土壤養分供給量不足、土壤乾燥のそれぞれの単一要因の影響は比較的良好に研究されているが、バイオマス配分や樹体内窒素配分に対するこれらの環境要因の交互効果については理解が不十分である (Xu et al. 2007)。特に、窒素固定樹種では、高 CO_2 に対する成長量の反応と併せて、生態系への窒素供給能力が注目されているため、樹体内バイオマス配分だけでなく樹体内窒素配分の反応を明らかにする必要がある。

1. 4. 9 落葉の性質に及ぼす CO₂ 濃度上昇の影響

樹木の高 CO₂ に対する反応を解明するためには、最終的には、樹木と土壌の間の物質循環の応答まで明らかにする必要がある。窒素固定樹種の窒素固定により樹体内に同化された窒素は、落葉落枝、枯死根、根からの滲出物などを通じて土壌へ供給される。落葉として土壌に供給された窒素は、微生物による分解を通じて植物が吸収できる形態として供給される。落葉の初期の化学的性質は落葉の分解速度を左右し、土壌の養分供給量を通じて樹木の成長に影響を及ぼす。

多くの木本樹種について高 CO₂ 下で生葉の窒素濃度が低下することは一致した見解が得られている (Norby 1987; Curtis 1996; Cotrufo et al. 1998; Norby et al. 1999; Norby et al. 2001)。一方、落葉の窒素濃度や分解速度に対する高 CO₂ の影響に関しては、まだ統一的な見解が得られておらず、高 CO₂ 下で落葉の窒素濃度が低下するという結果や (Arp 1997; O'Neill and Norby 1996; Cotrufo et al. 1998; Liu et al. 2005; Parsons et al. 2008; Liu et al. 2009)、落葉の窒素濃度に対する高 CO₂ の影響が少ないかほとんどないという結果 (Norby et al. 2001; Hall et al. 2005; Vizoso et al. 2008) が報告されている。

落葉の窒素含量は生葉の性質だけでなく葉の老化時の窒素再吸収効率 (resorption efficiency : 成熟葉の窒素含量に対する、落葉時に再吸収された窒素の割合; Killingbeck 1996) にも依存する。しかし、養分再吸収効率に対する高 CO₂ の影響に関する情報も不足している (Vogel et al. 1997; Norby et al. 2001; Norby and Iversen 2006)。窒素固定樹種は窒素固定能を持たない樹種に比べて通常の CO₂ 濃度環境で窒素再吸収効率が低く、落葉中の窒素濃度が高い (Killingbeck 1996; Uliassi and Ruess 2002; Tateno et al. 2003)。高 CO₂ 下では光合成のダウンレギュレーションによりルビスコ量が減少する 경우가多く、同時に、葉の単位面積当たりの重量 (LMA) が増加する場合が多い。ルビスコは老化時に再吸収されやすい可溶性窒素に含まれ、LMA は細胞壁等の再吸収されにくい構造的窒素への窒素配分量と関連がある。そのため、高 CO₂ 下では、再吸収されやすさの違いから、葉内の可溶性窒素と構造的窒素の比 (Pugnaire and Chapin 1993) の変化に窒素再吸収効率が影響を受ける可能性が指摘されている (Arp et al. 1991; Norby et al. 1999, 2001)。シンク能が高いと考えられる窒素固定樹種が、他の窒素固定能を持たない樹種に比べて高 CO₂ による光合成のダウンレギュレーションを受けにくい場合、葉内の可溶性窒素と構造的窒素の比の変化が少なく、窒素再吸収効率に及ぼす影響も小さい可能性が考えられる。

1. 4. 10 実験手法について

樹木の高 CO₂ に対する応答研究では、根の成長抑制などの人為的影響が少なく、より大きな個体を対象に長期間実施できる開放型 CO₂ 付加実験 (Free Air CO₂ Enrichment; FACE) が理想的と考えられている。これまでに諸外国で FACE 研究が十年近く進められているが、土壌を含む生態系内の物質循環に及ぼす高 CO₂ の影響を検出するためには、まだ研究の継続が必要と考えられている (ESF-Forest FACE Group et al. 2010)。一方、FACE 研究のような野外実験では、影響している要因の特定が難しいという問題もある。森林生態系の CO₂ 収支予測のためのシミュレーションモデルでも、高 CO₂ 下での樹木の資源制約応答に関して改良が必要な部分が多い状態である。このような状況から、環境調節実験施設を用いた制御環境下での高 CO₂ 応答実験の必要性が再認識されている。

1. 5 本研究の目的と本文の構成

本研究では、1. ハンノキ属のケヤマハンノキの天然更新林分における窒素固定量の推定と、2. 窒素固定能力を持つケヤマハンノキを「シンク能を高く維持することのできる樹種」としてとらえ、大気中の CO₂ 濃度上昇時の光合成のダウンレギュレーションを回避するメカニズムを、土壌養分等の資源制約を受けたときの反応を元に解明することを目的とした。

第2章では、ケヤマハンノキの天然更新林分における窒素固定量の把握を目的とした。日本中部、岐阜県高山市の林道建設により土壌が攪乱された立地に天然更新した約 18 年生のケヤマハンノキの一林分を調査地として、データの不足している成木の林分あたりの窒素固定量の推定を試みた。まず、窒素固定量の推定に必要な根粒の分布とサイズ構成について記述的なデータを収集し、ケヤマハンノキ林分の根粒バイオマスの量的評価を行った (2. 1 節)。次に、単位根粒重量あたりの窒素固定活性の季節変化をアセチレン還元法を用いて明らかにし、ケヤマハンノキの成長様式、環境条件との関係から単位根粒重量あたりの年間の窒素固定量を推定した。さらに、2. 1 節で明らかにした根粒のサイズ構造、根粒バイオマスの結果と併せて林分あたりの窒素固定量を推定した。リターフォール中の窒素含量、葉リターの分解速度、草本層の窒素量、土壌中の窒素蓄積量を測定し、推定した窒素固定量の林分内の窒素循環における寄与を評価した (2. 2 節)。さらに、ケヤマハンノキ林分内に更新した主な樹種についてケヤマハンノキとの分布相関を解析し、更新樹種の分布に対するケヤマハンノキの分布の影響を評価した (2. 3 節)。以上の結果から、ケヤマハンノキ天然更新林分における窒素固定量の把握と、窒素固定能力による土壌肥沃化と、樹種更新への効果についてまとめた。

第3章と第4章では、ケヤマハンノキは順次開葉型の開葉様式を持つことに加え、根粒が光合成生産物のシンクとして機能するため「シンク能が高い樹種」と見なされるため、他の窒素固定能を持たない樹種に比べて、光合成のダウンレギュレーションを回避し、理論的な予想に近い高CO₂応答を示すことができるという作業仮説をもとに、高CO₂環境でのケヤマハンノキ稚樹の光合成・成長反応を解明することを目的とした。高CO₂に対するケヤマハンノキ稚樹の生理的・形態的反応に及ぼす土壌養分・水分条件の影響を明らかにするために、高CO₂と土壌窒素供給量の複合要因実験と、高CO₂と土壌リン酸供給量、土壌水分条件の複合要因実験を行った。第3章では、高CO₂と土壌窒素供給量の複合要因実験(実験1)の結果を示した。まず、ケヤマハンノキの根粒形成の高CO₂応答を明らかにした(3.1節)。次に、窒素固定樹種の高CO₂に対する光合成応答の特殊性を明らかにすることを目的として、ケヤマハンノキと窒素固定能を持たない樹種との比較を試みた。比較対象樹種には北方系森林群落の主要構成樹種であるミズナラとイタヤカエデを用いた。北方系樹種を選択したのは、高緯度地域ほど気候変動の影響を受けやすいと予想されているためである(IPCC 2007)。光合成反応と成長に及ぼす高CO₂の影響(3.2節)と、窒素固定を通じて土壌へ供給される窒素量の指標として落葉の性質(窒素濃度、C/N比)と落葉前の窒素再吸収効率に及ぼす影響を明らかにした(3.3節)。第4章では、高CO₂と土壌中のリン酸供給量の不足と土壌乾燥の複合要因実験(実験2)の結果を示した。ケヤマハンノキの、根粒形成とニトロゲナーゼ活性、光合成反応、成長反応に及ぼす効果を明らかにした。この実験では、ハンノキ属の他の樹種が同じ反応を示すのか確認することを目的としてケヤマハンノキと亜属の異なるミヤマハンノキとの比較も行った。

第5章の総合討論では、まず第2章のケヤマハンノキ林分での窒素固定量の推定に関してこれまでの報告例との比較考察を行った(5.1節)。続いて、第3章と第4章の二つのCO₂付加実験の結果を統合してケヤマハンノキの高CO₂に対する反応に及ぼす土壌養分・土壌水分条件の影響を考察した(5.2節)。第6章で、総括として、以上の結果を基に、ケヤマハンノキの窒素固定能力—光合成能力間のフィードバック機構を通じての解釈を試みた。

第2章

人為的な土壌攪乱後に天然更新したケヤマハンノキ 林分における窒素固定

この章では、道路工事により土壌の攪乱を受けた立地に天然更新したケヤマハンノキ林分において、林分レベルの窒素固定量の評価を試みた。まずケヤマハンノキの根粒の分布と根粒のサイズ構造、さらに林分あたりの根粒バイオマスの評価について結果を示す。

2. 1 ケヤマハンノキ天然更新林分における根粒の水平分布とバイオマス

2. 1. 1 背景

ケヤマハンノキによる共生的生物窒素固定量を評価するためには、実生から林分までどのような規模であれ根粒バイオマスの測定が必要となる。根系のサンプリングや採集が難しいことから、地下部バイオマスやその時間に伴う増減についての正確なデータは、地上部バイオマスに比べて少ない (Akkermans and van Dijk 1976; Sharma and Ambasht 1986; Rytter 1989; Tateno et al. 2004; Hendricks et al. 2006; Coleman 2007; Helmisaari et al. 2007; Sakai et al. 2007)。人工林では、林分レベルでハンノキ属樹種の根粒バイオマスを推定する研究がいくつか報告されている。若齢の小さなサイズでは、全木掘り取りにより作成した相対成長式を用いて樹木個体サイズから根粒バイオマスの推定を行っている (Binkley 1982; Bormann and Gordon 1984; Vitousek and Waker 1989 (注: ヤマモモ属))。また、林齢の高い人工林では、樹木個体の周囲で採取した一定面積の土壌枠内 (例えば $0.5 \times 0.5 \text{ m}$ や $0.2 \times 0.2 \text{ m}$) に含まれる量から根粒バイオマスの推定を行っている (Binkley 1981; Sharma and Ambasht 1986; Binkley 1992; Lee and Son 2005; Son et al. 2007)。人工林の結果から、ハンノキ属樹種の根粒バイオマスは林齢や樹種構成 (Sharma and Ambasht 1986; Son et al. 2007)、個体サイズや立木密度 (Bormann and Gordon 1984) などに依存して変動することが示された。河川の氾濫源や道路脇のような場所に天然に更新したハンノキ属樹種の林分では、樹木の分布が人工林に比べて不均一であり、根粒バイオマスの分

布の不均一性も人工林に比べて大きくなることが予想される。

ハンノキ属樹種の根粒の水平分布は、他の樹種の太い根や細根と同様、閉鎖林での研究が充分ではない。Rytter (1989) は、*Alnus incana* の若齢人工林 (3-7 年生) において、根粒の水平分布パターンが太い根と細根の間であることを示した。いくつかの研究で太い根のバイオマスは幹に近い場所に最も多く分布し (Millikin and Bledsoe 1999)、細根は幹からの距離に関係なく分布している (Leuschner et al. 2001) ことが報告されている。一方、Yanai ら (2006) は、20-70 年生の高齢の北方系広葉樹林でも、細根バイオマスの水平分布が樹木個体の位置に影響を受けていることを示した。また、Rytter (1989) は、5 年生未満の *Alnus incana* の林分で、幹からの距離に対して根粒密度に大きなばらつきがあり、幹の近くに根粒が集中的に分布したが、林齢の増加と共に根粒密度の水平的なばらつきが少なくなり、根粒の水平分布がより均一になることも示した。天然更新林分では、人工林よりも林分内の樹木個体サイズの変動が大きいことが予想される。そのため、土壌が攪乱を受けた後に天然更新した林分のように、齢の変動幅が少ない林分であっても、根粒の水平分布の変動が大きい可能性がある。

ハンノキ属樹種の根粒はフランキアが側根に感染して形成される (Baker and Schwintzer 1990; Huss-Danell 1997)。根粒は多年生であり、大きなサイズまで成長する (Akkermans and van Dijk 1976; Sharma and Ambasht 1986)。根粒のサイズの増加と共に窒素固定を行わない部分の量が増加するため、根粒の齢やサイズは根粒のニトロゲナーゼ活性に影響を及ぼす (Sharma and Ambasht 1984; Hurd et al. 2001; Sharma et al. 2010)。もし樹木個体サイズにより根粒のサイズ構成が変動するのであれば、窒素固定の評価のために根粒のサイズ構成を考慮する必要がある。

日本中部、岐阜県高山市において、林道建設により土壌が攪乱された立地に天然更新したケヤマハンノキの低密度の林分において、林分あたりの窒素固定量を推定するために根粒バイオマスの評価を行った。次の 2 つの予想を立てた。1. 単位面積あたりの根粒バイオマス (根粒量密度) の水平分布は、樹木個体からの距離に依存して大きく変動するだろう。2. 樹木個体サイズ間で根粒のサイズ構成に違いがあるだろう。これらの予想を確かめるために、根粒の分布と根粒のサイズ構成について記述的なデータを収集し、ケヤマハンノキ林分の根粒バイオマスの量的評価を行った。この研究では、根粒の枯死生成速度 (回転速度) を評価することはできなかったが、ある時点での構造的な記述も、林分レベルでの速度論的な過程の評価に必要なことと考える。

2. 1. 2 材料と方法

2. 1. 2. 1 調査地

調査地は日本中部、岐阜県高山市岩井町、乗鞍岳の麓の標高約 1100 m の林道脇に設定した (36°9'N、137°15'E)。調査地の近辺の気象観測データ (岐阜大学流域環境研究所の観測データ; 標高 1340 m) によると、1990 年から 1995 年の間の年平均気温は 7.1°C、年平均降水量は 2190 mm である。ケヤマハンノキ林分に 30 m × 35 m の調査枠を設置した。42 箇所のサブプロット (5 m × 5 m) に区分した。調査地はほぼ南向き (141°12') である。傾斜は緩やかでプロット内の高低差は 5.2 m である。調査地は、林道建設前の時点で緩やかな谷であった。1975 年にこの調査地を通過して林道が開通したが、この道路建設の際にのり面切り取りにより生じた土砂で谷が埋められた。この道路建設に伴う攪乱跡地にケヤマハンノキが天然更新して林分を形成したと考えられる。調査地の林冠木は全てケヤマハンノキであった。平均樹高は約 15 m であり、林冠はほぼ閉鎖している (Hasegawa and Takeda 2001)。地上 1.3 m の位置の幹の直径 (胸高直径; dbh) を、1995 年の 4 月から 11 月まで、1996 年の 5 月から 10 月まで測定した。平均 dbh (\pm SD) は、1995 年 4 月で 12.4 (\pm 3.8) cm であり、dbh の頻度分布は一山型であった (図 1)。この dbh の頻度分布から同程度の齢の個体により構成される林分であることが示唆される。立木密度は 1114 ha⁻¹、胸高断面積合計は 14.8 m² ha⁻¹ である。調査期間中に枯死する個体が数個体存在したため、立木密度は 1995 年 4 月の 1114 ha⁻¹ から 1996 年 5 月の 1038 ha⁻¹ へ変化した。また、平均 dbh (\pm SD) と断面積合計も、1995 年 4 月の 12.4 (\pm 3.8) cm と 14.8 m² ha⁻¹ から、1996 年の 6 月の 13.3 (\pm 3.9) cm と 15.7 m² ha⁻¹ へ変化した。調査地の林床は草本植物に覆われていたが、数種の高木種と低木種も更新していた。ただし、ケヤマハンノキを含めて窒素固定樹種は更新していなかった。隣接する林分は薪炭林として利用されていたと考えられる林分で、現在は、クロマツ、ミズナラ、シラカンバ、ウワミズザクラ、ダンコウバイ、フサザクラが優占していた。調査地の中央付近で、土壌深 10 cm と 20 cm の土壌温度を成長期間を通じて (1995 年 4 月 21 日から 12 月 1 日、1996 年 5 月 8 日から 12 月 8 日) 30 分間隔でデータロガーを用いて測定した (Grant SQ8-4U, Cambridge, England)。

2. 1. 2. 2 ケヤマハンノキの分布様式

生残するケヤマハンノキの水平分布様式を Ripley's $K(t)$ 関数 (Besag 1977; Ripley 1977; Diggle 1983; Nanami et al. 1999) を改変した $L(t)$ 関数を用いて解析した。Ripley's $K(t)$ 関数 (Ripley 1977) は次のように定義される:

$$K(t) = n^{-2} |A| \sum_{i \neq j} \sum w_{ij}^{-1} I_t(u_{ij}) \quad (1)$$

t は個体を中心とした円の半径 ; n は調査地内の個体数 ; $|A|$ は調査地 A の面積 ; u_{ij} は調査地内での i 番目と j 番目の個体間の距離 ; $I_t(u)$ は $u \leq t$ のときに 1 で、その他の場合 0 となる係数 ; w_{ij} は i 番目の個体の中心と半径 u_{ij} の円周のうち、調査地 A 内に含まれる割合 (プロットからはみ出した部分の考慮) : t 以上離れていない全ての個体のペアを合計する (Ripley 1977; Diggle 1983; Nanami et al. 1999)。Besag (1977) が提案しているように $K(t)$ を平方根で変換するとより利用しやすくなる :

$$L(t) = [K(t) / \pi]^{0.5} - t \quad (2)$$

$L(t) = 0$ の場合、距離 t での空間分布がランダムであることを意味する。 $L(t) > 0$ の場合、集中分布を意味し、 $L(t) < 0$ の場合、規則分布を意味する。この関数の統計的有意性はモンテカルロシミュレーションにより示される (Besag 1977; Nanami et al 1999)。帰無仮説は、調査地内で完全に空間的にランダム分布をしているというものである。実際に観察されたデータセット数と同じ数の点をランダムに分布させる作業を調査地内で 1000 回試行する。毎回のランダムデータセットに対して、 $t = 0.5$ m から $t = 10.0$ m まで 0.5 m 間隔で $L(t)$ を計算する。 $L(t)$ 値の頻度分布を用いて、95% と 99% 信頼区間を決めた。

2. 1. 2. 3 根粒の水平分布、サイズ構造、バイオマス

ケヤマハンノキの根粒バイオマスの季節変化を明らかにするために 1995 年の 6 月、7 月、9 月、10 月の 4 回測定を行った。調査地内の樹木個体サイズの範囲を代表させるように調査地内で dbh の順番が 20 番目、40 番目、60 番目、80 番目の樹木個体サイズを基準として、dbh が 9 cm から 20 cm の範囲で 5 個体を選んだ (Hasegawa and Takeda 2001)。各個体の幹の外側から周囲 1 m の根系を注意深く掘り起こした。この研究では、1 m 以内とは、幹の外周から始めて 1 m を意味しており、幹の中心からの距離は 1 m を超えることになる。対象個体以外の根系は可能な限り注意深く区別し除外した。対象個体の基部 (幹の外側) から 20 cm 間隔 (0 - 20, 20 - 40, 40 - 60, 60 - 80, 80 - 100 cm) に分けて、範囲内に出現する全ての根粒を採取した。深さ方向の根粒分布に関しては、ケヤマハンノキの大きな個体でも、20 cm 土壌深より深い場所には根粒はほとんどなく (Okabe 2002)、他の研究でも、

Alnus incana の根系が浅く、バイオマスの 90% 以上が表層土壌 9 – 10 cm の範囲に出現した (Rytter 1989) ことから、本研究では土壌表層 20 cm 以内に出現する全根粒を採取した。6 月以外の 3 回の測定 (7 月、9 月、10 月) では、根粒を採取する場所を 4 方位 (東西南北) を境に 4 区画に分けて採集した。採集した全ての根粒について、根粒に付随している根の根粒基部での直径 (付随する根の直径) を測定した。腐朽程度の少ない根粒では、根粒のサイズや重量と付随する根の直径の間に正の相関関係があった。根粒の腐朽の程度は変動が非常に大きいため、本研究では、付随する根の直径を根粒サイズを表す指標として用いた。根粒に付着した土壌や有機物を取り除いた後、洗浄し、80°C で乾燥させた。根粒数と重量の測定を行い単位面積あたりの値に換算した (それぞれ、根粒数密度、根粒量密度と呼ぶ)。この報告では、4 回のサンプリング時の 18 個体の根粒数データと、3 回のサンプリング時の 12 個体の根粒バイオマスデータを示す。今回の評価方法では、各個体の幹から周囲 1 m 以内出現する全ての根粒数と根粒バイオマスを評価し、この範囲以外には対象個体に関わる根粒は存在しないものと仮定し、樹木個体あたりの根粒数と根粒バイオマスを推定した。樹木個体サイズ (dbh) と個体あたりの根粒バイオマスの関係と立木密度から、林分あたりの根粒バイオマスを推定した。

ケヤマハンノキの根粒は樹冠面積を超えて分布し、胸高直径 46 cm の樹木個体では幹から 8 m 以遠まで分布した (Okabe 2002)。本研究の調査地では、最も dbh が大きい個体の樹冠は幹から 4 m の位置まで広がっていた。本研究では、幹の外周から 1 m の範囲に限ったサンプリングのため、サイズの大きい樹木個体の根粒バイオマスは過小評価になる可能性が高い。そこで比較のため、異なる計算方法により根粒バイオマスの推定を試みた。根粒バイオマスの別の推定方法として、実際に根粒採取の対象とした面積あたりの根粒バイオマスの計算を行った (推定 2)。幹の外側から周囲 1 m を円で表し、調査地内の全個体の周囲 1 m の円で表される面積を算出した。重なった部分を除いて、対象とする面積を image-J (Wayne Rasband National Institute of Health, USA) により計算した。対象面積は 1995 年が 336.8 m² となり、この面積あたりの根粒バイオマスとして林分あたりの根粒バイオマスを推定した。さらに別の推定方法として、幹からの距離ごとの樹木個体サイズと根粒バイオマスの関係式の組み合わせにより個体全体の根粒バイオマスを推定するという方法を試みた (推定 3)。幹の周囲から 60 – 80 cm の範囲と 80 – 100 cm の範囲の根粒バイオマスでは、常に 80 – 100 cm の範囲の根粒バイオマスのほうが少なかった。そこで、幹からの距離に伴う根粒バイオマスの変化を直線的な変化と仮定し、最外周の 2 領域の根粒バイオマスの関係 (傾きが負の直線関係) がより遠い範囲まで保たれ、単純に減衰すると仮定して根粒バイオマスを推定した。その結果、根粒の分布は

幹の外側から 2 m 以遠まで拡大することはなかった。

2. 1. 2. 4 統計解析

統計解析は JMP (SAS Institute 2003) を用いて行った。共分散分析 (ANCOVA) により、樹木個体サイズ (dbh) の効果を評価した。全ての解析で、連続変数である樹木個体サイズを共変数として用いた。根粒の水平分布の解析では、単位面積あたりの根粒数を従属変数として用いた。まず、方位と幹の外周からの距離を独立変数 (カテゴリー変数) として解析した。もし方位間で差がない場合は、続く解析で全方位のデータを併せて解析した。次に、幹の外周からの距離とサンプリング時期を独立変数として解析を行った。もしサンプリング時期による差がない場合は、続く解析で全てのサンプリング時期のデータを併せて解析した。樹木個体サイズと幹からの距離の間に交互効果がある場合は、幹からの距離ごとに樹木個体サイズと単位面積あたりの根粒数の間の相関解析を行った。根粒バイオマスの水平分布の解析では、単位面積あたりの根粒バイオマスを従属変数として用い、単位面積あたりの根粒数のときと同じ手順で解析を行った。

根粒のサイズ構成の解析では、まず、各個体の幹の外周から 1 m の範囲内におけるそれぞれの根粒サイズ階 (付随する根の直径で表す) の根粒数の頻度を従属変数として用いた。根粒サイズ (10 クラス; 1 mm 間隔で、0 - 1 mm から 9 - 10 mm まで) とサンプリング時期を独立変数として用いた。サンプリング時期間で差がない場合は、続く解析で全てのサンプリング時期のデータを併せて解析した。次に、単位面積あたりの根粒数を従属変数として用い、幹の外周からの距離と根粒サイズを独立変数として解析を行った。樹木個体サイズと他の独立変数の間に交互効果がある場合は、樹木個体サイズと単位面積あたりの根粒数の間の相関解析を別々に行った。

根粒サイズ構成は 2 つのパラメータのワイブル分布関数 (Weibull 1951; Bailey and Dell 1973; Tanouchi and Yamamoto 1995) を用いて評価した。

$$f(x) = 100 (c/b) (x/b)^{c-1} \exp(-(x/b)^c) \quad (3)$$

b は分布の中心に関係するパラメータ (ワイブルスケール変数) で分布の平均を表す。 c は対称性に関するパラメータ (ワイブルシェイプ変数) で分布の形を表す (Weibull 1951)。根粒サイズ構成を、付随する根の直径の 1 mm 間隔の頻度分布に対してワイブル分布関数を当てはめて計算した。観測値と計算値の差を Kolmogorov - Smirnov test により解析した。個体サイズとワイブル分布の二つのパ

ラメータ (b, c) の相関解析を行った。この解析では、全てのサンプリング時期を併せて用いた。分布のパラメータ c の値は、 $c < 1$ が逆 J 型の分布、 $c = 1$ が指数型の分布を表す。3.25 < c < 3.61 の範囲のとき正規分布に近い分布を表し、この範囲より c が小さい場合、値の大きい方へ分布が偏り、逆に c がこの範囲より大きい場合、値の小さい方へ分布が偏る。

2. 1. 3 結果

2. 1. 3. 1 ケヤマハンノキの分布

調査地のケヤマハンノキ林分では、被圧されている個体が存在した (図 1)。1995 年 4 月より以前に枯死した個体も多数存在した (図 1, 2)。1995 年 4 月時点で生残しているケヤマハンノキは、0.5 – 1 m、5.5 – 6 m、8 m ($P < 0.05$) と 8.5 – 10 m ($P < 0.01$) の空間スケールで有意な集中分布を示した (図 3)。

2. 1. 3. 2 根粒数の水平分布

幹の周囲の方位間で単位面積あたりの根粒数 (根粒数密度) に一貫した違いは見られなかった (データは示していない)。幹の周囲の根粒数密度は、サンプリング時期には影響を受けず、樹木個体の dbh と幹からの距離の間の交互効果 ($P < 0.0001$) で示されるように樹木個体サイズにより変動した (表 1)。サイズの小さな樹木個体では、根粒数密度は幹に最も近い範囲 (0 から 20 cm) に集中して分布する傾向を示し、幹からの距離が遠くなるに従い指数関数的に減少した (図 4)。樹木個体サイズが大きくなるにつれて、幹からの距離による根粒数密度の差は減少した。幹からの距離別に樹木個体サイズと根粒数密度の関係をみると、幹に最も近い範囲 (0 から 20 cm) では、根粒数密度は樹木個体サイズの増加とともに減少した ($P = 0.003$)。反対に、幹からより遠い範囲の根粒数密度は樹木個体サイズの増加に伴って増加する傾向を示した (60 – 80 cm; $P = 0.0002$, 80 – 100 cm; $P = 0.054$)。幹の外周から 1 m の範囲内の根粒数密度の分布の重心は樹木個体サイズの増加に伴い幹から遠い位置になった (図 5; $P < 0.0001$)。幹の外周から 1 m の範囲内では、樹木個体サイズと全根粒数の間に有意な関係は見られなかった (データは示していない; $P = 0.301$)。

2. 1. 3. 3 根粒のサイズ構造

根粒のサイズ構造は最大 9.0 mm まで分布した (図 6)。ケヤマハンノキの根粒の約 70% が 3 mm

未満のサイズであった。全てのサンプリング時期で各根粒サイズクラスの根粒数の割合は樹木個体サイズにより変動した。このことは、樹木個体サイズ (dbh) と根粒サイズクラスとの交互効果により示される (表 2; $P = 0.0029$)。サイズの小さな樹木個体ほど、より小さなサイズ階の根粒の割合が高かった。根粒のサイズ頻度分布にあてはめたワイブル分布の二つのパラメータ b と c は、樹木個体サイズ (dbh) の増加につれて増大する傾向を示した (図 7)。ワイブルシェイプパラメータ c は、dbh が 9.2 cm から 20.9 cm の範囲に対して 1.42 から 2.47 の範囲であった。この値はゆるやかなベール型分布に近い分布であることを示す。スケールパラメータの b は分布の中心に関連する値であり 1.85 から 3.03 の範囲であった。これらの結果は個体サイズ間で根粒のサイズ構造が異なることを意味し、樹木個体サイズの増大に伴い、根粒サイズ階が小さいものから大きいものへ移行していることが示唆された。

全てのサンプリング時期において、樹木個体サイズと根粒数密度の関係は根粒サイズクラスと幹からの距離により変動した (表 3)。このことは、樹木個体サイズ (dbh) と根粒サイズクラスと幹からの距離の間の交互効果により示される (表 3; $P < 0.0001$)。幹の外周から 0 から 20 cm の範囲では、全てのサイズ階の根粒数密度が樹木個体サイズの増加に伴い減少する傾向を示した (表 4; 最上段の行)。幹からの距離が 20 から 40 cm の 1 mm より大きなサイズ階 (表 4; 上から 2 行目) とより幹から遠い範囲の全ての根粒サイズ階 (表 4; 上から 3-5 行目) では、樹木個体サイズと明瞭な関係がないか、もしくは、個体サイズの増加につれて根粒数密度が増加する傾向が見られた。

2. 1. 3. 4 根粒バイオマスの水平分布

幹の周囲の方位間で単位面積あたりの根粒バイオマス (根粒量密度) に一貫した違いは見られなかった (データは示していない)。3 回のサンプリング時において、幹から 20 cm 間隔の根粒量密度の水平分布は、樹木個体のサイズ間で変動した (図 8)。このことは、樹木個体サイズ (dbh) と幹からの距離の間の交互効果により示される (表 5; $P = 0.0005$)。全サンプリングデータを合わせた場合、樹木個体サイズと幹の外周から 20 cm 間隔の根粒量密度の関係は、根粒数密度と同様のパターンを示した。つまり、最も幹に近い範囲 (0 - 20 cm) の根粒量密度が、樹木個体サイズの増加に伴い減少する傾向を示した ($P = 0.096$)。反対に、幹からより遠い範囲の根粒量密度は樹木個体サイズの増加につれて高くなった (20 - 100 cm; $P < 0.05$)。幹の外周から 1 m の範囲の根粒量密度の分布の重心は、樹木個体サイズの増加と共に、幹から遠くなった (図 9A)。根粒数の場合と違い、幹の外周から 1 m の範囲の根粒バイオマスは樹木個体サイズの増加と共に増加した (図 9B; [根粒バイオマ

ス] = 0.442 [dbh]^{2.01}, $R^2 = 0.747$, $P < 0.001$)。個々の幹の外周から 1 m の範囲に存在する単位面積あたりの根粒バイオマス (根粒量密度) も樹木個体サイズと有意な関係を示した (データは示していない; [単位面積あたりの根粒バイオマス] = 0.168 [dbh]^{1.90}, $R^2 = 0.723$, $P < 0.001$)。図 9B の関係式を用いて、樹木個体あたりの平均的な根粒バイオマスを推定した。1995 年の 4 月の値は、77.5 g (± 3.8 (標準誤差)) (5.6 から 199.2 g) と推定された。立木密度を元に根粒バイオマスを調査林分の面積あたりで計算した場合、1995 年 4 月時点の根粒バイオマスは 84.1 kg ha⁻¹ と推定された。

根粒バイオマスを、調査地内の各個体の幹の周囲 1 m の面積を合計した面積あたりとして計算した場合、1995 年 4 月の根粒バイオマスは、269.4 kg ha⁻¹ であった (推定 2)。また、幹からの各距離ごとの根粒量から個体の根粒量を推定する方法では、今回の個体サイズの範囲では幹から 2 m 以遠には根粒が分布しないという結果になり、1995 年 4 月の根粒バイオマスは、104 kg ha⁻¹ と推定された (推定 3)。

2. 1. 4 考察

2. 1. 4. 1 根粒の水平分布

今回調査したケヤマハンノキの天然更新林分 (約 18 年生) で、幹からの距離に伴う根粒の水平分布様式は樹木個体サイズ (dbh) 間で大きく変動した (図 4, 5, 8, 9A)。特に、被圧個体を含む dbh の小さな樹木個体では根粒密度の変動が大きく、幹に近い部分の根粒密度が高かった。反対に、サイズの大きな樹木個体 (林分内の平均 dbh は 12.4 cm) では、幹からの距離の違いによる根粒密度の変動が少なかった (図 4)。根粒の水平分布について今回得られた結果と同様の傾向が、若齢の *Alnus incana* の人工林の林齢の異なる林分間で報告されている。その内容は、5 年生未満の林分では幹の近くに根粒が密に分布するが、林齢の増加につれて根粒の水平分布がより均一に向かう傾向にあるという結果であった (Rytter 1989)。人工林と異なり、本研究のケヤマハンノキの天然更新林分では、ケヤマハンノキが集中分布を示し (図 2, 3)、樹木個体サイズ (dbh) に大きな変動幅が見られた (図 1)。これらの点が、林齢の差がなくとも同一林分内で根粒の水平分布に大きな変動が見られた理由と考える。本研究では、対象とした樹木個体の幹の外周から 1 m 以内の範囲に出現した他のケヤマハンノキ個体の根粒は含めていないが、Rytter (1989) は個体を区別をせず出現した根粒を全て含めているという違いがある。本研究でも、対象とした樹木個体以外の根粒も考慮に入れると根粒の水平分布がより均一になったかどうかは今回の報告では明らかにできない。Yanai ら (2006) は、20 年

から 70 年生という高齢の北方性広葉樹林でも、太根のバイオマスと同様、細根のバイオマスが樹幹の近い部分に最も多いことを示し、根系測定時に樹木の分布様式を考慮する必要性を提案している。

ハンノキ属樹種の根粒は、太根と細根の中間的な分布様式を示す (Rytter 1989)。細根の分布も個々の樹木個体の位置に依存する場合もあることから、今回ケヤマハンノキの結果で示したように根粒の分布も樹木の分布様式に影響を受けることが予想される。そのため、天然更新林分で根粒を調査する際には、樹木の分布様式と樹木個体サイズを考慮する必要があると考える。

2. 1. 4. 2 根粒のサイズ構造

根の直径の分布に関する情報は、根系と土壌の機能を理解するための基礎となるが、現時点での情報は限られている (Blouin et al. 2007; Zobel et al. 2007)。本研究では、根粒のサイズを根粒に付随する根の直径で表した。これは、ハンノキ属樹種の根粒が、フランキアの感染により側根が変形して形成されたものであり、しかも、多年生で部分的に腐朽が生じるためである (Baker and Schwintzer 1990; Huss-Danell 1997)。根粒の齢を粒 (lobe) の分岐状態で 3 群 (若い・中庸・古い) に区分した研究例もある (Sharma and Ambasht 1986; Sharma et al. 2010)。本研究のケヤマハンノキの天然更新林分では、根粒のサイズ構造も樹木個体サイズ間で大きく変動することを明らかにした (図 6, 7)。根粒のサイズ構造は、樹木個体の dbh の増加につれて、小さいサイズから大きなサイズへ移行した。根粒の齢やサイズがニトロゲナーゼ活性に影響することが報告されている (Sharma and Ambasht 1984; Hurd et al. 2001; Sharma et al. 2010)。そのため、天然更新林分で窒素固定速度を評価する際には、樹木個体サイズ間の根粒のサイズ構造の違いを考慮する必要があるかもしれない。

それぞれのサイズの根粒数密度は幹からの距離と樹木個体サイズに依存して変動した (表 3)。より大きいサイズ (> 2 mm) の根粒数密度は樹木個体サイズの増加と共に増加する傾向を示したが、幹から最も近い範囲 (0 - 20 cm) の根粒数密度は、根粒の全てのサイズ階において大きい樹木個体より小さい樹木個体のほうが高かった (表 4)。この理由として 2 つの可能性が考えられる。一つは根粒の老化・腐朽である。dbh の大きな樹木個体の幹に最も近い範囲では、根の肥大に伴い一部が土壌表面にさらされ腐朽している根粒が観察された。このことから、樹木個体サイズの大きな個体のほうが、根粒の老化・腐朽の速度が速いことにより幹に最も近い範囲での根粒数密度が比較的低下しているのかもしれない。二つ目は、サイズの大きなケヤマハンノキ個体が生育する土壌中の窒素が、サイズの小さな個体の周囲の土壌より増加したことで根粒形成が抑制されたという考えである。

ケヤマハンノキの純林では、ハンノキ属樹種の存在により無機態窒素濃度が少なくとも 2 倍増加し

た (Son et al. 2007)。 *Alnus crispa* も北方の冷温帯林で土壌の無機態窒素生成量を増加させた (Rhoades et al. 2001)。土壌中の窒素濃度が高い場合、根粒の形成が抑制されることが知られている (Martin et al. 2003; Bollman and Vessey 2006)。しかし、本研究で数カ所測定した限りでは樹木個体サイズと土壌の無機態窒素量の間に関連は検出されなかった (データは示していない)。原因の解明には、多点での測定が必要と考える。

2. 1. 4. 3 根粒バイオマス

アクチノリザル植物の根粒バイオマスは林齢、立木密度、樹木個体サイズなどにより変動する (Bormann and Gordon 1984; Sharma and Ambasht 1986; Vitousek and Walker 1989)。本研究では、それぞれの個体の樹幹の外周から 1 m 以内に出現する根粒バイオマスが樹木個体サイズの増大に伴い増加した (図 9B)。面積単位の根粒バイオマスは 1995 年 4 月時点で 84.1 kg ha^{-1} と推定された。この値はこれまでにハンノキ属樹種で報告されている 30 から 480 kg ha^{-1} という範囲内の値であった (表 6; Zavitkovski and Newton 1972; Binkley 1981, 1982; Bormann and Gordon 1984; Sharma and Ambasht 1986; Rytter 1989; Binkley 1992; Lee and Son 2005; Son et al. 2007)。これらの値の中には、ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) 人工林で土壌サンプリング法により推定した、27 年生林分で 179.3 kg ha^{-1} (Son et al. 2007)、38 年生林分で 220 kg ha^{-1} (Lee and Son 2005) という二つの結果も含まれる。これら二つの結果に比べると今回の約 18 年生のケヤマハンノキ天然更新で 84.1 kg ha^{-1} という値は低い値であった。

数種のハンノキ属樹種について樹木個体 dbh と葉バイオマスの相対成長関係が示されている (Binkley 1982; Bormann and Gordon 1984; Tadaki et al. 1987)。本調査林分の樹木個体 dbh と根粒バイオマスの関係 (図 9B) から、葉バイオマスの多い個体は根粒バイオマスも多いことが示唆される。本調査地の葉リター量は 1995 年が 3.07 t ha^{-1} であり、他の林分に比べて多いわけではない (Sharma and Ambasht 1987; Rytter 1989)。本調査地のケヤマハンノキ林分における葉リター量に対する根粒バイオマスの割合は 1995 年で 2.7% であり、報告されている範囲 (5.6% から 9.8%) より低かった (Akkermanns and Dijk 1976; Tripp et al. 1979; Binkley 1981; Bormann and Gordon 1984)。この結果から、方法上の誤差により、今回のケヤマハンノキ林分での根粒バイオマスを過小評価している可能性が示唆された。

2. 1. 4. 4 根粒バイオマスの推定方法

本研究では、ケヤマハンノキ林分の根粒バイオマスを、樹木個体サイズ (dbh) と根粒バイオマス

の間の相対成長式（図 9B）から算出した個々の樹木個体あたりの根粒バイオマスと立木密度を元に調査地面積あたりの値で推定した。本研究で測定の対象とした樹幹周囲 1 m の範囲の総面積は、調査地面積 (30 × 35 m) の約 3 分の 1 にしかならないため、今回のように立木密度を元に計算した根粒バイオマスは過小評価になりそうである。根粒バイオマスの過小評価につながる別の理由は、特にサイズの大きな樹木個体で、幹の外周から 1 m よりも広い範囲に根系が伸びているためと考えられる。例えば、dbh が 46 cm のケヤマハンノキの根粒は、樹冠面積を超えて分布し、幹から 8 m 以上離れた場所まで存在した (Okabe 2002)。本研究では、dbh が最も大きい個体 (dbh = 22 cm) の樹冠は幹から 4 m の範囲まで広がっていた。本研究では樹幹の外周から 1 m までの範囲しか根粒を採取していないので、大きなサイズの樹木個体の根粒バイオマスは過小評価になった可能性が高い。ケヤマハンノキの根系は水平には限られた範囲しか発達せず、幹の周囲に集中する傾向がある (Karizumi 1979) が、根粒バイオマスをより正確に把握するためには、樹冠面積の範囲内の調査が必要になりそうである。

以上のように、今回の林分あたりの根粒バイオマスの推定量は過小評価である可能性が高い。推定手法の比較のために、他の二つの評価方法の結果も参考に示した。まず、対象とした面積あたりで換算した場合（推定 2）、1995 年の根粒重量は 269.4 kg ha^{-1} となった（葉リターに対する値が 9.0%）が、この値は、報告されている範囲内の値ではあるが、幹に近い場所のみを用いて推定しているため、林分あたりでは過大評価になると予想される。次に、各樹幹からの距離ごとの個体サイズと根粒量の関係式を組み合わせて個体の根粒量を推定した場合（推定 3）、林分あたりの根粒バイオマス量は 104 kg ha^{-1} であった（葉リターに対する値が 3.5%）。この方法で推定された根粒の分布範囲は、最も遠くても幹の外周から 2 m 以内であり、この林分の最大樹幹面積までは対応していなかった。以上のように、推定方法により林分あたりの根粒バイオマスの結果は大きく変わることを認識した上で、今回の手法で得られた結果を窒素固定量の推定に用いなければならないだろう。

2. 1. 4. 5 まとめ

結論として、天然更新したケヤマハンノキ林分における個々の樹木の周囲の根粒の水平分布は、同齢林分内でも、樹木個体サイズにより大きく変動した。また、樹木個体サイズにより個々の個体周辺の根粒のサイズ構造も大きく変動した。これらの結果はある一時期の構造的な記述であるが、天然更新した林分での根粒バイオマスの評価の際には、樹木個体サイズと個々の個体の位置を考慮に入れる必要があることを示唆することができた。今回、評価された根粒量は、天然更新したケヤ

マハンノキ林分あたりの窒素固定量の推定に利用することができる。

表1 4回のサンプリング(6月,7月,9月,10月)における幹外周からの距離(0-20 cm, 20-40 cm, 40-60 cm, 60-80 cm, 80-100 cm)ごとの単位面積あたりの根粒数(根粒数密度; 個 m²)の共分散分析

Source of variance	Nodule number per area (number m ²)				
	SS	df	MS	F	P > F
Dbh (Co)	7585.0	1	7585.0	4.0	0.049
Distance (D)	292362.6	4	73090.6	38.5	<0.0001
Co x D	84877.4	4	21219.4	11.2	<0.0001

樹木個体サイズ (dbh, cm) (Co) はモデルにおける共変量として解析を行った。幹からの距離 (D) とサンプリング月は、独立変数として解析を行った。df, 自由度; SS, 平方和; MS, 平均平方

表2 4回のサンプリング月(6月,7月,9月,10月)における根粒サイズ(0-1 mm, 1-2 mm, 2-3 mm, 3-4 mm, >4 mm)ごとの根粒の頻度(個 m²)の共分散分析

Source of variance	Frequency of nodule number				
	SS	df	MS	F	P > F
Dbh (Co)	0.035	1	0.035	19.6	<0.0001
Nodule size (S)	2.378	9	0.264	148.3	<0.0001
Co x S	0.047	9	0.005	2.9	0.0029

樹木個体サイズ (dbh, cm) (Co) はモデルにおける共変量として解析を行った。根粒サイズ (S) とサンプリング月は、独立変数として解析を行った。df, 自由度; SS, 平方和; MS, 平均平方

表3 根粒サイズ(0-1 mm, 1-2 mm, 2-3 mm, 3-4 mm, >4 mm)と幹外周からの距離(0-20 cm, 20-40 cm, 40-60 cm, 60-80 cm, 80-100 cm)ごとの単位面積あたりの根粒数(根粒数密度; 個 m²)の共分散分析

Source of variance	Nodule number per area (number m ²)				
	SS	df	MS	F	P > F
Dbh (Co)	3594.5	1	3594.5	45.0	<0.0001
Nodule size (S)	76957.1	9	8550.8	107.0	<0.0001
Co x S	12834.6	9	1426.1	17.8	<0.0001
Distance (D)	8802.7	4	2200.7	27.5	<0.0001
Co x D	3146.5	4	786.6	9.8	<0.0001
S x D	42887.9	36	1191.3	14.9	<0.0001
Co x S x D	13340.1	36	370.6	4.6	<0.0001

樹木個体サイズ (dbh, cm) (Co) はモデルにおける共変量として解析を行った。根粒サイズ (S) と幹からの距離 (D) は、独立変数として解析を行った。df, 自由度; SS, 平方和; MS, 平均平方

表 4 幹からの距離と根粒サイズごとの、樹木個体サイズ (dbh, cm) と単位面積あたりの根粒数 (根粒数密度; m^{-2}) 間の相関解析

Distance from stem (cm)	Root diameter at nodule base (mm)									
	0 - 1		1 - 2		2 - 3		3 - 4		>4	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
0 - 20	-0.478	0.045	-0.521	0.027	-0.817	<0.0001	-0.416	0.086	-0.519	0.027
20 - 40	-0.368	0.133	-0.084	0.741	0.427	0.077	0.311	0.209	0.108	0.669
40 - 60	-0.129	0.610	0.110	0.663	0.605	0.008	0.644	0.004	0.456	0.057
60 - 80	0.204	0.417	0.662	0.003	0.671	0.002	0.587	0.011	0.342	0.165
80 - 100	0.055	0.830	0.449	0.062	0.595	0.009	0.462	0.053	0.477	0.045

表 5 3回のサンプリング月 (6月, 9月, 10月) における幹の外周からの距離 (0-20 cm, 20-40 cm, 40-60 cm, 60-80 cm, 80-100 cm) ごとに関する単位面積あたりの根粒バイオマス (根粒重密度; g m^{-2}) の共分散分析

Source of variance	Nodule biomass per area (g m^{-2})				
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P > F</i>
Dbh (Co)	1785.2	1	1785.2	2.2	0.148
Distance (D)	53907.5	4	13476.9	16.3	<0.0001
Co x D	20011.8	4	5003.0	6.0	0.0005

樹木個体サイズ (dbh, cm) (Co) はモデルにおける共変量として解析を行った。幹からの距離 (D) とサンプリング月は、独立変数として解析を行った。*df*, 自由度; *SS*, 平方和; *MS*, 平均平方

表 6 ハンノキ属樹種の林分あたりの根粒バイオマス (kg ha^{-1}) の推定例。引用文献 (References) と、林齢 (age)、立木密度 (tree ha^{-1}) の記載がある場合は記した。

Species	Nodule Biomass (kg ha^{-1})	age	tree density (tree ha^{-1})	References
<i>Alnus hirsuta</i>	88	17	1114	this study
<i>Alnus hirsuta</i>	179.3	27	1960	Son et al. (2007)
<i>Alnus hirsuta</i>	95.2	27	1130	Lee and Son (2005)
<i>Alnus hirsuta</i>	220	38	700	Lee and Son (2005)
<i>Alnus glutinosa</i>	444	5-20		Akkermans (1971)
<i>Alnus incana</i>	110	3	40000	Rytter (1989)
<i>Alnus incana</i>	230-480	7		Rytter (1989)
<i>Alnus incana</i>	150	30		Johnsrud (1978)
<i>Alnus nepalensis</i>	180-252	5-40		Sharma et al. (2010)
<i>Alnus nepalensis</i>	457	7	715	Sharma and Ambasht (1986)
<i>Alnus nepalensis</i>	149	56	435	Sharma and Ambasht (1986)
<i>Alnus rubra</i>	117	7		Zavitkovski and Newton (1968)
<i>Alnus rubra</i>	244	30		Zavitkovski and Newton (1968)
<i>Alnus rubra</i>	390			Binkley (1981)
<i>Alnus rubra</i>	62	5	1240	Bormann and Gordon (1984)
<i>Alnus rubra</i>	146	5	10091	Bormann and Gordon (1984)
<i>Alnus rubra</i>	250-325	55	3000	Binkley (1992)
<i>Alnus sinuata</i>	130	5		Binkley (1982)
<i>Alnus sinuata</i>	110			Binkley (1981)

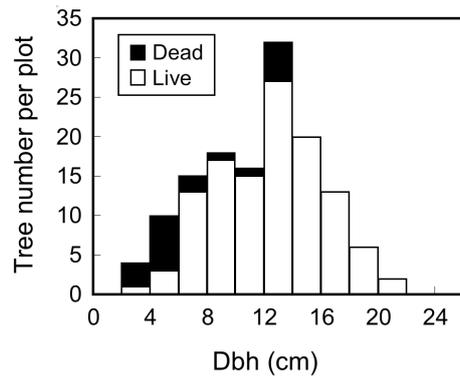


図 1. ケヤマハンノキの胸高直径 (dbh) の頻度分布。1995 年 4 月時点の生残個体 (白棒) と 1995 年 4 月以前の枯死個体 (黒棒)

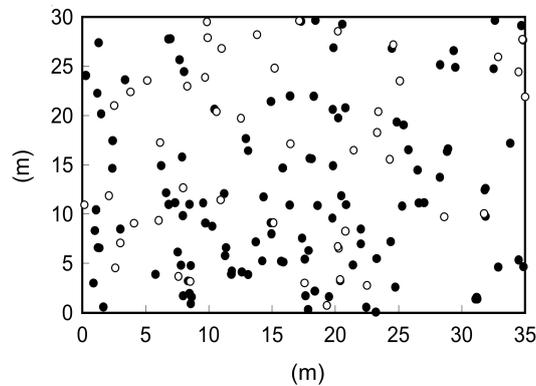


図 2. 1995 年 4 月時点のケヤマハンノキの生残個体と枯死個体の分布。1995 年 4 月時点の生残個体 (黒丸) と 1995 年 4 月以前の枯死個体 (白丸)

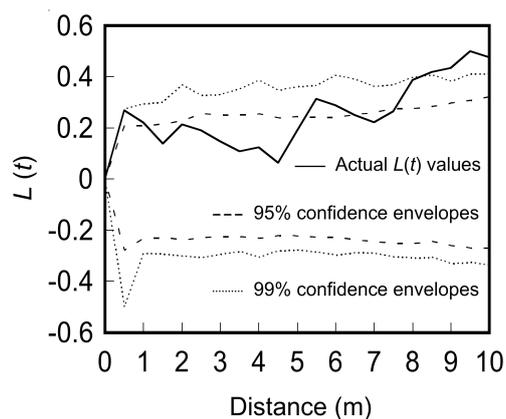


図 3. 1995 年 4 月時点のケヤマハンノキの分布様式 ($L(t)$ 値)。実線が実際に観察された個体の $L(t)$ 値を示す。点線と破線は、それぞれ、モンテカルロシミュレーションにより、調査地内で個体数と同じ数の点をランダムに分布させる作業を 1000 回試行した結果から得られた、95% と 99% 信頼区間を示す。区間の外側は、ランダム分布から有意に離れていることを意味する。

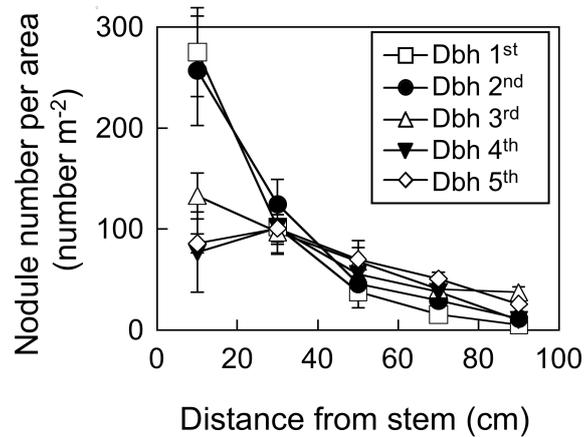


図 4. 樹木個体サイズ (dbh, cm) と幹の外周からの距離ごとに示した単位面積あたりの根粒数 (根粒数密度; nodule number per area) 分布。値は幹の外周から 1 m 以内について 20 cm 間隔ごとの合計値で示す。各樹木個体サイズ階ごとに全てのサンプリング月のデータを併せて用いた。樹木個体のサイズは、調査地内の個体サイズの範囲を代表させるように、dbh の順番が 20 番目、40 番目、60 番目、80 番目を基準として 5 段階に分けた。各サイズ階でサンプリングを行った樹木個体の dbh の範囲を以下に示す： Dbh 1st; 9.2 – 10.3 cm (n = 4)、Dbh 2nd; 11.2 – 13.0 cm (n = 4)、Dbh 3rd; 13.9 – 14.9 cm (n = 4)、Dbh 4th; 15.6 – 16.0 cm (n = 3)、Dbh 5th; 18.4 – 20.9 cm (n = 3)

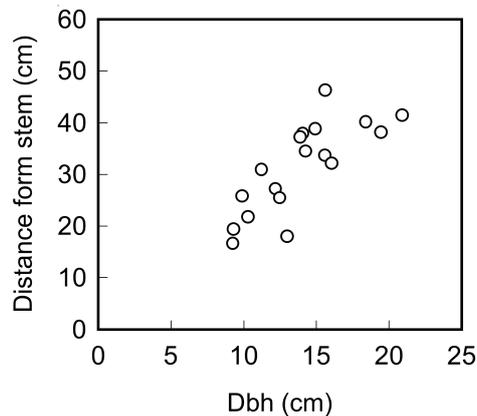


図 5. ケヤマハンノキの幹の外周から 1 m の範囲内における単位面積あたりの根粒数 (根粒数密度) の分布の重心。根粒数密度は、幹の外周から 1 m の範囲内の 20 cm 間隔のデータを用いて計算した。この図では、サンプリング月は全て併せて示した。

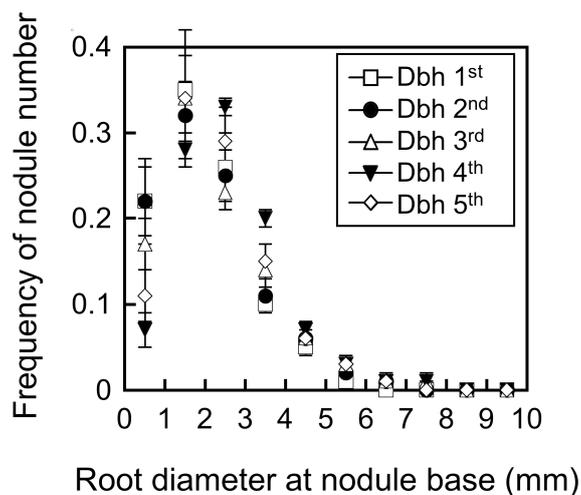


図 6. サンプルング個体の根粒のサイズ階構造。根粒のサイズは根粒に付随する根の直径により表した。サンプルング月は各樹木個体サイズ階ごとに全て併せて示した。樹木個体のサイズ (dbh, cm) は、調査地内の個体サイズの範囲を代表させるように、dbh の順番が 20 番目、40 番目、60 番目、80 番目を基準として 5 段階に分けた。各サイズ階でサンプルングを行った樹木個体の dbh の範囲を以下に示す： Dbh 1st; 9.2–10.3 cm (n=4)、Dbh 2nd; 11.2–13.0 cm (n=4)、Dbh 3rd; 13.9–14.9 cm (n=4)、Dbh 4th; 15.6–16.0 cm (n=3)、Dbh 5th; 18.4–20.9 cm (n=3)

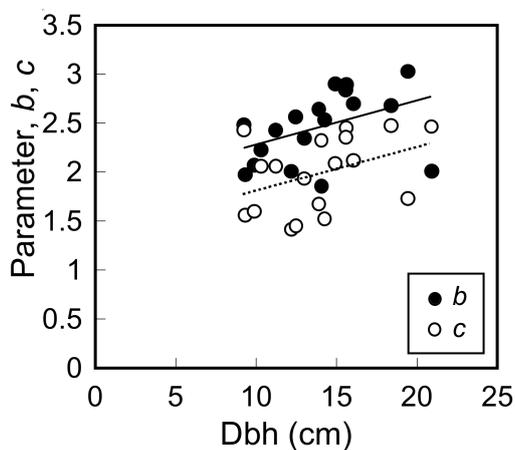


図 7. 樹木個体サイズ (dbh, cm) と根粒サイズ階構造にワイブル分布をあてはめたときの二つのパラメータ、ワイブルスケールパラメータ b (黒丸)、ワイブルシェイプパラメータ c (白丸) の関係。実線 (パラメータ b に対して) と点線 (パラメータ c に対して) は統計的に傾向の見られるものを示した ($P < 0.1$)。それぞれの回帰式を以下に示す: [パラメータ b] = $0.044 [\text{dbh}] + 1.84$ ($n = 18, R^2 = 0.171, P = 0.088$); [パラメータ c] = $0.045 [\text{dbh}] + 1.36$ ($n = 18, R^2 = 0.160, P = 0.100$)

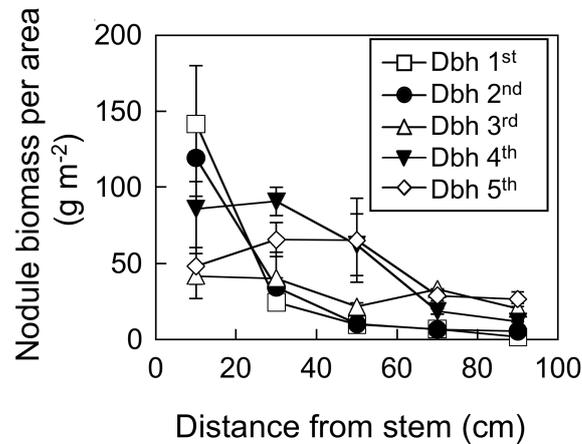


図 8. 樹木個体サイズ (dbh, cm) と幹の外周からの距離ごとに示した単位面積あたりの根粒バイオマス (根粒量密度) 分布。値は幹の外周から 1 m 以内について 20 cm 間隔ごとの合計値で示す。各樹木個体サイズ階ごとに全てのサンプリング月のデータを併せて用いた。樹木個体のサイズ (dbh, cm) は、調査地内の個体サイズの範囲を代表させるように、dbh の順番が 20 番目、40 番目、60 番目、80 番目を基準として 5 段階に分けた。各サイズ階でサンプリングを行った樹木個体の dbh の範囲を以下に示す: Dbh 1st; 9.2 – 10.3 cm (n = 3)、Dbh 2nd; 12.2 – 13.0 cm (n = 3)、Dbh 3rd; 13.9 – 14.9 cm (n = 2)、Dbh 4th; 15.6 – 16.0 cm (n = 2)、Dbh 5th; 18.4 – 19.4 cm (n = 2)

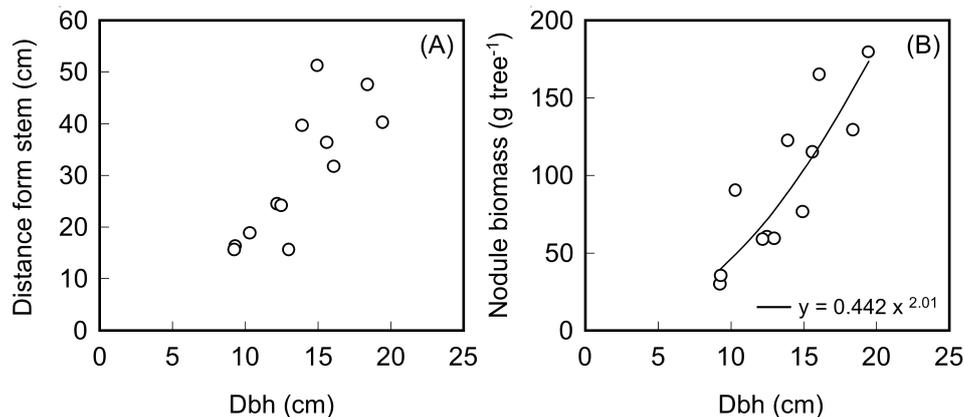


図 9. ケヤマハンノキの幹の外周から 1 m の範囲内における単位面積あたりの根粒バイオマス (根粒量密度) の分布の重心 (A) と、樹木個体あたりの根粒バイオマス (nodule biomass; B)。根粒量密度 (A) と樹木個体あたりの根粒バイオマス (B) は、幹の外周から 1 m の範囲内の 20 cm 間隔のデータを用いて計算した。これらの図では、サンプリング月は全て併せて示した。実線は最小二乗の回帰曲線を示す (B): [根粒バイオマス] = 0.442 [dbh]^{2.01}, (n = 12, R² = 0.747)

2. 2 ケヤマハンノキの成長様式、ニトロゲナーゼ活性、林分内の窒素動態

2. 2. 1 背景

根粒で窒素固定を行うためには宿主樹木からの十分なエネルギー（光合成生産物）の供給が必要であり (Huss-Danell 1997; Valverde and Wall 2003)、根粒へ配分される光合成生産物量の変化に対して根粒のニトロゲナーゼ活性は敏感に変動する (Wheeler 1971; Valverde and Wall 2003)。根粒のニトロゲナーゼ活性（窒素固定活性）は広範囲の環境要因、光、温度、水分条件、無機養分、土壌 pH などに影響を受け (Winship and Tjepkema 1985; Huss-Danell 1990)、寒さのストレス、長期的な暗処理、アンモニア態窒素の過剰供給、乾燥ストレスや灌水などに対しても敏感に反応する (Pawlowski and Newton 2008)。これらの要因による活性低下の多くが葉から根粒へ送られる炭水化物（光合成生産物）の供給量不足と関係している (Lundquist and Huss-Danell 1991, Lundquist et al. 1993; Huss-Danell 1997; Valverde and Wall 2003)。

北方の温帯林では、アクチノリザル植物は主に高木種か低木種の落葉広葉樹であるため、ニトロゲナーゼ活性は、春の芽吹き開始時に最初に検出され、葉の多くが完全に開き終わる初夏から盛夏にかけて最大に達し、秋の落葉時に活性がなくなるという季節変化を示す (Schwintzer et al. 1982; Huss-Danell 1990; Tsutsumi et al. 1993)。ニトロゲナーゼ活性が、葉から根粒へ輸送される新たに生産された光合成生産物に依存しているため (Wheeler 1971)、根粒は根や発達中の葉や果実などと競合する“シンク”と見なされる (Hall 1979; Huss-Danell and Sellstedt 1983)。宿主樹木の伸長成長や肥大成長、開花結実、落葉などの成長パターンが、光合成生産物の獲得競争を通じてニトロゲナーゼ活性に影響する可能性がある (Pizelle 1984)。特にアクチノリザル植物が窒素の要求量を窒素固定に依存している間は、窒素固定活性と成長（個体サイズや総葉面積）や光合成速度の間に正の相関関係を示す (Huss-Danell and Sellstedt 1983; Huss-Danell 1990, 1997)。

ただし、宿主樹木の林齢の増加に伴い窒素要求量に変化し、根粒のニトロゲナーゼ活性や樹木個体あたりの窒素固定量に変化する (Sharma and Ambasht 1988, Sharma et al. 2002; Son et al. 2006)。 *Alnus nepalensis* の林分では15年から20年程度で窒素固定量が最大になった (Sharma and Ambasht 1988; Sharma et al. 2002)。林分内の窒素循環における窒素固定量の寄与率もハンノキ属樹種の林齢の増加に伴い低下した (Sharma et al. 2002)。このように、成木個体では、貯蔵窒素、窒素の樹体内転流、土壌窒素の蓄積や樹木の窒素利用量の変化に伴い、窒素吸収量に対する窒素固定への依存度が変化し、

成長様式がニトロゲナーゼ活性に及ぼす影響の大きさが実生や稚樹の場合と異なることが予想される。天然更新林分では、林分内の個体サイズの変動が大きいことが予想されるため、根粒バイオマスの分布と同様に、林齢間で見られるニトロゲナーゼ活性の変化等が、同一林分内の個体サイズ間で生じるかもしれない。例えば、サイズの大きな樹木個体ほどニトロゲナーゼ活性が低下することや、逆に、被圧木では、光合成生産物が不足し、根粒のニトロゲナーゼ活性の低下が生じる可能性が考えられる。

ハンノキ属樹種のようなアクチノリザル植物の根粒は、マメ科植物の根粒と異なり多年生である (Baker and Schwintzer 1990; Huss-Danell 1997)。そのため、ケヤマハンノキ 1 個体内に様々なサイズの根粒が存在する (2. 1 節; 図 6)。また、根粒の分布がケヤマハンノキ個体のサイズや幹からの距離に影響を受けただけでなく、根粒のサイズ頻度分布も樹木個体サイズにより変化した (2. 1 節)。根粒の齢やサイズによりニトロゲナーゼ活性が変化することが報告されていることから (Sharma and Ambasht 1984; Huss-Danell 1990; Hurd et al. 2001)、樹木個体ごとの根粒サイズ構造の違いも、窒素固定量を推定する際に考慮する必要があるかもしれない。

アクチノリザル植物の窒素固定を通じた土壌への窒素供給により、土壌中の窒素蓄積 (肥沃化) (Huss-Danell 1992a, 1992b; van Cleve et al. 1993; Wurtz 1995; Rhoades et al. 2001; Myrold and Huss-Danell 2003) や、人工林でハンノキ属樹種と混植した際の針葉樹の葉の窒素含量の増加や成長量の増加が生じる (Vogel and Gower 1998; Brockley and Sanborn 2003)。このようなアクチノリザル植物が森林生態系へ窒素を供給する効果には、窒素固定能に加えて落葉中に大量の窒素を保持しているという性質も貢献している (Huss-Danell 1997)。特に、ハンノキ属樹種は落葉時の窒素引き戻しが少なく (Cote 1989; Tateno 2003)、固定された窒素の多くの部分が葉リター中に含まれる。窒素含量が高い葉リターは C/N 比が低く、分解速度も早いことが予想される (Osono and Takeda 2004)。一方、ハンノキ属樹種の葉は植食昆虫による被食を受けやすい傾向があり (Kikuzawa et al. 1979; Tadaki et al. 1987)、植食昆虫の糞を通じて供給される窒素も林床への窒素付加の一つの経路となりうる (Meehan and Lindroth 2007)。

本節では、ケヤマハンノキ林分における窒素固定量を推定し、林分内の窒素動態における寄与率を推定することを目的とした。被圧木と林冠構成木のような樹木個体のサイズの違いにより、根粒のニトロゲナーゼ活性が変化するだろうと予想した。ケヤマハンノキのフェノロジーと、根粒のニトロゲナーゼ活性の季節変化を明らかにし、両者の関係から単位根粒量あたりの窒素固定量を推定した。さらに 2. 1 節で明らかにした根粒バイオマスのデータを元に、林分あたり窒素固定量の推

定を行い、林分内の窒素移動量・蓄積量を明らかにし、窒素固定量の林分内の窒素循環に対する寄与の評価を試みた。Sharma and Ambasht (1988) では、18年生の林分は、窒素吸収量に対する窒素固定の寄与が最も高い林齢の範囲に含まれる。今回の研究では、比較的寄与率が高いと予想される林分における窒素循環に対する窒素固定の位置付けを試みた。

2. 2. 2 材料と方法

2. 2. 2. 1 成長様式

前節（2. 1 節）と同じ調査地の林縁の日当たりの良い場所に生育するケヤマハンノキ 2 個体を対象木とし、当年枝 93 本（4 本の 2 年枝系、16 本の 1 年枝系）について 1996 年 5 月から 11 月まで、月 1 回の頻度でフェノロジーの記載を行った。当年枝長、出現した葉の数（葉身が出た葉）とサイズ（長さ × 幅）、着葉数（落葉数）、雄花と雌花の数と長さ、新芽の数を調査した (Hasegawa and Takeda 2001, 2004)。葉のサイズ（長さ × 幅）を葉面積に換算するために、6 月から 9 月まで毎月、当年枝 30 本の全ての葉のサイズと葉面積を測定した。11 月までの値の最大値に対する相対値として各測定項目の各月の値を示した。展開した生葉の面積（着葉葉面積）の計算は 11 月までに出現した全ての葉の面積の合計（総葉面積）を最大値として計算した。この研究では 1995 年の枝葉のフェノロジーが 1996 年と同じパターンを示すと仮定した。枝あたりの平均葉数や平均葉面積は、選択した枝を観察する方法により変動し、年によっても異なることが予想される。しかし、葉の発達パターンや落葉パターンは樹種により特徴のあるものである (Kikuzawa 1978)。本研究では、可能な限り当年枝間の変動を少なくするために、数本の太枝で観察を行った。窒素含量分析のために葉と当年枝を毎月採取した。調査地内のケヤマハンノキ全個体の胸高直径 (dbh) を、1995 年と 1996 年の成長期間を通じて毎月測定した。根粒の成長を、根粒の粒の長さの継続調査により評価した。3 個体のケヤマハンノキの根粒 ($n = 156$) を測定した。1996 年 5 月に根系を掘り、根粒に印を付け埋め戻した。6 月から毎月掘り起こし、マークした場所からの伸長量を測定した。1996 年の 6 月から 11 月まで、ニトロゲナーゼ活性を測定した根粒の根粒伸長量も測定した。測定には実態顕微鏡を用い、前年成長終了点を確認し、そこからの伸長量を測定した。

各器官の成長様式は、単純ロジスティック式を用いて回帰し、データを解析した。

$$D_t = D_{\max} / (1 + \exp(-\lambda(t - t_m))) \quad (1)$$

t は日 (DOY)、 D_{\max} は各パラメータの最大値、 t_m は最大の成長速度を示す日 (DOY)、 λ は増加速度、をそれぞれ示す。

2. 2. 2. 2 リターフォール

開口面積 0.25 m^2 、メッシュサイズ 1 mm のリタートラップを用いてリターを採取した。10 個のリタートラップを規則的に調査地内に配置した。1995 年 5 月から 12 月、1996 年 6 月から 12 月にかけて、月 1 回の頻度で回収した。1996 年 12 月から 1997 年 4 月にかけて、冬期間のリターフォール量を把握するために、 $2 \text{ m} \times 2 \text{ m}$ の 1 mm メッシュの寒冷紗トラップを使ってリターを採取した。5 個のトラップを調査地内にランダムに配置した。リターは 80°C で乾燥させ、ケヤマハンノキの各器官を分けた (葉、托葉、枝、芽、雄花、雌花、球果、種子)。また他の樹種の葉、枝、種子も区分した。虫糞も原形を留めており、評価が可能と判断されたのでサイズ別に区分した ($< 0.5 \text{ mm}$, $0.5 - 1.0 \text{ mm}$, $> 1.0 \text{ mm}$)。1995 年のリターについて、ケヤマハンノキの葉と他の器官のリターの窒素含量を分析した。

シュートレベルで調べた開葉様式の落葉パターンの結果 (2. 2. 2. 1) とリターフォールの結果から、林冠レベルの相対的な着葉量の季節パターンを推定した。推定の際にいくつかの仮定を置いた。まず、葉重量と葉面積の季節変化が同じと仮定した。具体的には、全落葉重量を 100 としたときの相対値で表した相対落葉重量の季節変化が、総落葉葉面積を 100 としたときの相対値で表した相対落葉葉面積の季節変化と同じであると仮定した。各リターフォール回収日間は落葉重量が直線的に変化すると仮定した。落葉開始日と落葉終了日は、前後 2 回の測定値から推定した。リターフォールから求めた相対落葉面積とシュートレベルの開葉様式から求めた相対落葉葉面積との差を計算し、差分を用いてシュートレベルで得られた着葉葉面積を補正した。得られた値を林冠レベルの相対着葉葉面積 ($cr\text{-LA}$) と呼び、解析に用いた。シュートレベルの開葉様式を測定したのは 1996 年のみであり、1995 年も同じ開葉様式を示すと仮定した。ただし、リターフォールのデータは 1995 年 1996 年それぞれの実測データを用いた。

2. 2. 2. 3 野外条件での根粒のニトロゲナーゼ活性の季節変化

根粒のニトロゲナーゼ活性をアセチレン還元法により測定した (Hardy et al. 1968; Hardy et al. 1973)。測定は、1995 年に 8 時期 (14 日)、1996 年に 7 時期 (12 日)、成長期間を通じて行った (1995 年 4 月

21日から12月1日、1996年5月10日から11月7日まで)。1995年には、測定時期ごとに調査地内で樹木個体サイズ (dbh) が 9 cm から 21 cm の範囲のサンプル個体を選んだ。測定に用いた個体数は測定時期により異なり、1 個体 (4、6、11、12 月)、3 個体 (7 月)、5 個体 (8、9 月) であった。1 個体あたり 6 から 18 の根粒クラスターについて単位根粒重量あたりのニトロゲナーゼ活性 (アセチレン還元法を用いたので、アセチレン還元活性 (Acetylene Reduction Activity: ARA) と呼ぶ) を測定した。1996 年には、サンプル個体を dbh が 6 cm から 21 cm の範囲で選んだ。毎回の測定の中で最も小さなサイズ階の 1 個体は被圧個体とし、被圧個体のアセチレン還元活性の評価を目的とした。4 月から 10 月に 4 個体、5 月と 11 月に 2 個体測定した。1 個体あたり 10 個 (6 月から 10 月)、6 個 (5 月と 11 月) の根粒クラスターのアセチレン還元活性を測定した。

測定は野外条件下で行った。2 cm 以上の根系を付けた状態で根粒を切除し測定に用いた。根粒の操作による活性の低下があるので操作は最小限にする必要があるため (Huss-Danell 1978; Wheeler et al. 1978)、根粒は採取後すぐに 200 ml のガラス製容器に密閉し、気相の約 10% をアセチレンに置換し培養した。培養容器内の温度が根粒が分布している範囲の土壌温度と同程度になるように、培養容器はあらかじめ土壌中に埋めた。12 時 30 分から 13 時 30 分の間に測定を行った。30 分間培養した後、培養容器内のガスサンプルを 3 ml の真空採血管 (Terumo Co., Tokyo, Japan) を用いて採取した (Mac'Nabb and Geist 1979)。実験室でサンプル中のエチレン量を FID 検出器を備えたガスクロマトグラフを用いて分析した (263-30, HITACHI, Tokyo, Japan)。炭化水素の分離には 1.0 m のガラスカラムを用いた (100/120-mesh Porapak R)。検出器の温度を 75°C、カラムの温度を 60°C に設定した。キャリアガスには窒素ガスを用いた。毎回アセチレンガス中のエチレン混入量をチェックしたが、いずれの場合もエチレンは検出されなかった。根粒からのエチレン発生も検出されなかった。予備実験により、安定した環境条件下でエチレン生成速度は少なくとも 3 時間の培養期間中安定していたことを確認した。

アセチレン還元法は、破壊的でなく、時間もかからず、安価なため、広く利用されている (Huss-Danell 1997)。アセチレン還元活性 (ARA) と窒素固定量の換算比は、理論的にはアセチレン 3 に対して窒素 1 (3 対 1) であるが、窒素の還元と同時に起きる H^+ の還元割合によって 4 対 1 付近まで変化する (Son et al. 2007)。重窒素 (^{15}N) 法を用いて換算比が報告されているが (Hobara et al. 2006)、生成された H_2 は通常ヒドロゲナーゼにより消費されるため、この換算比を固定することは難しい。本研究では、換算比として 3 対 1 を用いたが、参照のために 4 対 1 の結果も併記した。

根粒にアセチレンを加えることで根粒の活性が数分後に低下し、長時間の培養によりアセチレン

還元活性を評価すると測定誤差を生じる場合がある (Winship and Tjepkema 1990; Schwintzer and Tjepkema 1994)。培養初期の活性の最大値を評価するためには開放系の分析システム (open-through) での測定が適しており、今回用いた閉鎖系での測定は適していないことが指摘されている (Schwintzer and Tjepkema 1994)。ただしハンノキ属樹種は、アセチレンによる活性の低下が少なく、しかも低下からの回復が早い共生系を持つため、閉鎖系でも誤差が少ないと考えられている (Tjepkema and Winship 1988; Schwintzer and Tjepkema 1994)。本研究では、アセチレンによる活性の低下の問題点を認識した上で培養時間を 30 分間として密閉容器を用いてニトロゲナーゼ活性をアセチレン還元活性 (ARA) として評価した。

2. 2. 2. 4 林分あたりの窒素固定量の推定

根粒のアセチレン還元活性 (Acetylene Reduction Activity: ARA) の季節変化は一般化線型モデルにより解析した (R Ver 2.6.1)。解析に用いた要因は、年、樹木個体サイズ (dbh)、相対着葉面積 (cr-LA)、根粒に付随する根の直径 (根粒サイズ)、幹からの距離、土壌温度である。モデルでは 2 生育期間のデータを用いた。解析の結果を基に次の 2 つのモデルを比較した。1. 相対着葉面積と根粒サイズと土壌温度のモデル、2. 相対着葉面積と根粒サイズのモデル。また、比較のため、ARA と土壌温度の関係のみを用いた推定も行った (モデル 3)。各樹木個体の根粒サイズ構成は、前節 (2. 1) で示した二つのワイブルパラメータ (b と c) と樹木個体サイズ (dbh) の関係式 (2. 1 節, 図 7) を用いて推定した。根粒サイズと根粒重量の関係は、6 月から 10 月までのサンプルの中で、目視で腐朽が確認されなかったものを用いて求めた ($[\text{根粒重量 (g)}] = 0.0413 \times [\text{根粒サイズ (mm)}]^{1.850}$; $n = 399$, $R^2 = 0.648$)。この式を用いて各根粒サイズ階の中央値における平均根粒重量を求めた。この推定では、根粒に腐朽がないという仮定をおいた。実際には根粒に腐朽があるので根粒重量が過大評価になることを認識している。また、前節 (2. 1) で示した 1995 年の樹木個体サイズと根粒サイズの関係、樹木個体サイズと根粒バイオマスの関係の結果が 1996 年にも当てはめられることができると仮定した。樹木 1 個体あたりの根粒バイオマスが 1 g と仮定した場合に、推定した根粒のサイズ頻度と各サイズ階の平均根粒重量から求められる各サイズ階の根粒重量を根粒重量比とした ($[\text{サイズ a の根粒重量比}] = [\text{サイズ a の頻度}] \times [\text{サイズ a の平均根粒重量}]$)。根粒サイズを考慮するモデル 1 と 2 では、根粒サイズごとに根粒 1 g あたりのアセチレン還元量を推定する。この結果に各根粒サイズの根粒重量比をかけて根粒サイズごとのアセチレン還元量を求めた。全サイズの合計を各個体の根粒サイズ構成を考慮した根粒 1 g のアセチレン還元量とした。モデル 3 では、根粒サイズを

考慮していないので、計算結果からそのまま根粒 1 g のアセチレン還元量を算出した。これら根粒 1 g あたりの値に樹木個体あたりの根粒バイオマスをかけて樹木個体あたりのアセチレン還元量を算出した。樹木個体あたりの根粒バイオマスは個体サイズ (dbh) から推定した ([根粒重量] = $0.442 \times [\text{dbh}]^{2.01}$; $n = 12$, $R^2 = 0.770$) (2. 1 節, 図 9B)。アセチレン還元量を窒素固定量に換算する際には、理論比の 3 対 1 と 4 対 1 の両方を用いた。プロット面積から、林分あたりの窒素固定量を推定した。

2. 2. 2. 5 リターバック法

リターバック法を用いて葉リターの分解速度を測定した。1995 年 11 月にケヤマハンノキの新鮮落葉 (雪上に落ちたばかりの落葉) を回収し 40°C で乾燥させた。メッシュサイズ 1 mm、10 cm × 10 cm のリターバックに、3 g の葉リターを入れた。単位面積あたりの葉リター量は、1995 年の林床に供給された単位面積あたりの年間落葉量に相当する量である。リターバックは調査地 (30 m × 35 m) の 42 のサブプロット (5 m × 5 m) 内の 10 箇所配置した。各サブプロット内に 1 m × 1 m の枠を 1 カ所設置し、14 個のリターバックを置いた。1995 年 12 月 1 日に設置した。林床の新規の落葉を除去した場所にリターバックを置き、リターバックと有機物層がよく接するように針金で固定した。リターバックは、1996 年 5 月から 12 月にかけての毎月と 1997 年の 5 月に回収した。毎回、各サブプロットから 1 個 (計 10 個) のリターバックを回収した。乾燥重量を測定し、化学分析に用いた。葉リターの分解係数 (k) は、次の指数分解モデルを用いて算出した (Olson 1963; Tateno et al. 2007) :

$$W_t / W_0 = \exp(-k t) \quad (2)$$

t は分解実験開始からの日数、 W_0 は初期葉リター重量 (g)、 W_t は t 日後の葉リター重量を示す。

2. 2. 2. 6 林床有機物と鉱物質土壌

1996 年 5 月から 11 月にかけて、毎月、50 cm × 50 cm 枠 3 カ所の林床植生と A₀ 層の有機物を採集した。A₀ 層の有機物は、枝、球果、粗有機物 (≥ 2 mm)、有機物 (< 2 mm) に分けた。同時に、同じ 50 × 50 cm 枠から、6 個の 100 ml 土壌コアサンプルを採取した。土壌コアは、表層の 0 - 4 cm から採取した。土壌サンプルは、有機物、細土 (< 2 mm)、れき (≥ 2 mm) に分けた。細土を用いて土壌含水比を測定した。1996 年の 5 月、8 月、11 月には、細土の炭素と窒素含量、可給態窒素量を分析した。8 月と 11 月には、細土を用いて、窒素無機化速度を測定した (化学分析の箇所詳細を記

述した)。1996年8月に、調査地内の中央付近の1カ所で土壌断面を掘り、土壌層中の炭素と窒素の垂直分布を測定した。400 ml 土壌コアサンプルは、表層から30 cm 深までは5 cm 間隔で採取し、さらに深い層では、40 cm、60 cm、85 cm 深で採取した。上記と同様の処理をして炭素と窒素含量を分析した。

2. 2. 2. 7 化学分析

リターフォール、生葉、樹冠下部の当年枝、リターバック法のサンプル（新鮮落葉と分解葉リター）、林床植生、 A_0 層の有機物、土壌サンプルの全窒素含量と全炭素含量を分析した (MT-600; Yanaco, Kyoto, Japan)。土壌サンプルの窒素無機化速度は、30 日間の培養により評価した。硝酸態窒素とアンモニア態窒素の初期値（現存量）は、細土 10 g に 100 ml の 2 規定 KCl 溶液抽出により求めた (Keeney and Nelson 1982; Hirobe et al. 2003; Tateno et al. 2004)。窒素無機化速度の測定のために土壌サンプル（細土 10 g）を 25°C で培養した。土壌水分含量は各サンプルの初期値に維持した。30 日後に初期値の分析と同様の手順で、KCl 溶液により抽出し、硝酸態窒素とアンモニア態窒素量を求めた。純無機化速度は、硝酸態窒素とアンモニア態窒素の総量の 30 日間の変化量として算出した。硝酸態窒素とアンモニア態窒素は分光光度計により分析定量した (U-1000; Hitachi, Tokyo, Japan)。窒素無機化速度は土壌中の可給態窒素量の指標として用いられる (Reich et al. 1997)。森林土壌では硝酸態窒素のほうがアンモニア態窒素に比べて移動性が高いため、純硝化速度も土壌の可給態窒素量に影響する (Binkley and Hart 1989; Tateno et al. 2004)。

2. 2. 2. 8 統計解析

分散分析 (ANOVA) で根粒のアセチレン還元活性に及ぼす樹木個体サイズの影響を解析した (JMP; SAS Institute 2003; $P < 0.05$)。大きな根粒では活性のない部分が多くなるため、アセチレン還元活性は測定に用いた根粒サイズによっても変動する。測定に用いる根粒は注意深く選定したが根粒サイズのばらつきは見られた。このため、アセチレン還元活性の季節変化について解析する際に、根粒サイズも考慮に入れるモデルを採用した。この解析の詳細は上述した (2. 2. 2. 4)。

2. 2. 3 結果

2. 2. 3. 1 フェノロジー

ケヤマハンノキのフェノロジーを調べた結果、最大の成長速度を示す時期は、当年枝伸長成長量、葉面積拡大、幹の肥大成長、根粒の伸長成長、花器官の伸長成長の順番であった（図 1, 表 1）。5 月上旬に、1 から 3 番目の葉位の葉が開葉したが、まだ完全には開かなかった（図 1A）。6 月にほとんど全ての当年枝で少なくとも 3 枚の葉が出現し、第 1 葉の 60% と第 2 葉の 30% はすでに落葉した。8 月までに 14 枚の葉を開葉させた当年枝も見られた。8 月上旬に新たな葉の生産は終了し、着葉葉面積が最大に達し、9 月上旬まで安定した。6 月から観察された落葉は 10 月上旬に急増した。11 月上旬にはフェノロジーを調査した樹冠下層の枝では全ての葉が落葉したが、同じ樹冠の上部には少量の葉が残っていた。当年枝の伸長成長は、開葉とほとんど同時に始まり、8 月中旬に終了した（図 1B）。幹の胸高直径 (dbh) は、6 月上旬から 9 月上旬まで増大した（図 1C）。根粒の粒の長さは、8 月から 9 月にかけて伸長した（図 1D）。繁殖器官（雌雄花）は 8 月から 9 月下旬まで伸長した（図 1E）。

胸高直径 (dbh) の肥大成長の季節変化は 2 年間で差がなかったが、dbh 増加量は年間と個体サイズ間で有意な差があった（図 2）。dbh の平均増加量（年間の相対成長率）は 1995 年が 0.54 ± 0.03 cm ($3.96 \pm 0.20\%$)、1996 年が 0.45 ± 0.03 cm ($3.07 \pm 0.17\%$) であった。被圧木の dbh 成長率は、大きいサイズの樹木個体より低かった。

2. 2. 3. 2 リターフォール

葉リターはフェノロジーの観察でも見られたように 6 月に落ち始め、成長期間を通じて増加し、11 月に一つのピークを示した（図 3A）。落下虫糞は生育期間を通じて見られ、1995 年には 7 月から 8 月と 9 月から 10 月に 2 つのピークを示し、1996 年には夏期に一つのピークを示した（図 3B）。全リターフォール量は、 $3.77 \text{ ton ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (1996 年は $3.87 \text{ ton ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) であった（表 2）。ケヤマハンノキの葉リターは $3.07 \text{ ton ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (1996 年は $3.10 \text{ ton ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) で全リター量の 81.4% (1996 年は 80.0%) を占めた。落下した虫糞量は $105 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (1996 年は $89 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) だった。冬期間のリターフォールは枝と芽 (63.7%) と繁殖器官 (34.2%; ほとんどが雄花) が含まれ、総量で $238 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ だった。冬期のリターフォール量を含めると 1996 年のリターフォール量は $4.11 \text{ ton ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ となり、ケヤマハンノキの葉リター、枝、繁殖器官が、それぞれ 75.4%、14.6%、3.1% を占めた。また冬期間のリターフォール量は、年間総リターフォール量の 5.8% に相当した。

2. 2. 3. 3 根粒のニトロゲナーゼ活性の季節変化

4月下旬には、10 cm 深の土壤温度は約 8 度で、開葉はまだ始まっておらず、ニトロゲナーゼ活性（アセチレン還元活性; ARA）は検出されなかった（図 4）。ARA は開葉後の 5 月上旬から検出され、開葉葉面積と土壤温度が最大になる 8 月上旬に最大に達した ($68.0 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ nodule hr}^{-1}$, 1995 年; $28 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ nodule hr}^{-1}$, 1996 年)。1995 年の 11 月上旬には雪に覆われ、土壤温度は約 5 度で 4 月下旬に測定した時の土壤温度より低かったが、まだ樹冠上部に葉が残っており、低い ARA が検出された。全ての葉が落葉した後の 12 月上旬には ARA は検出されなかった。2 年間で 8 月上旬の ARA には大きな変動があった（1995 年 > 1996 年）が、全体的な季節変化は年間で大きな違いがなかった（図 4）。樹木個体サイズと ARA の間には一貫した傾向が見られなかった（図 5）。被圧木は必ずしも他の大きいサイズの樹木個体に比べて ARA が低い訳ではなかった。

2. 2. 3. 4 窒素固定量の推定

一般線形化モデル解析の step AIC の手順により、3 つの要因（年、樹木個体サイズ (dbh)、幹からの距離）は ARA の説明変数から除外された。モデル選択では根粒に付随する根の直径（根粒サイズ）、相対着葉面積 (*cr-LA*) が ARA の変動を説明するパラメータとして選択された (AIC = 3082, Residual deviance (残渣の逸脱度) = 467.7) (表 4-1)。上記 2 要因のモデルに、土壤温度を要因として加えた場合、AIC = 3082.8, Residual deviance = 466.72 であった（表 4-2）。土壤温度を要因として加えない場合との AIC の差が小さかったため、今回の研究では土壤温度も ARA の変動を説明する要因の一つとしてモデルに加えた。本研究では、補正相対葉面積 (*cr-LA*)、樹木個体ごとの根粒のサイズ構造、土壤温度の 3 変数によるモデルを ARA の予測に用いた（モデル 1）。

$$[\text{ARA}] = \exp(1.12 + 0.033 [\textit{cr-LA}] - 0.247 [\text{根粒サイズ}] + 0.036 [\text{土壤温度}]) \quad (3)$$

ARA は葉面積の増加と土壤温度の上昇に伴い上昇した（図 6）。また、根粒サイズの負の効果があり、根粒サイズの増加に伴い ARA が低下した。推定した相対着葉面積、30 分間隔の土壤 10 cm 深の地温データを用いて、根粒サイズ階ごとの根粒 1 g あたりのアセチレン還元量を、成長期間を通じて計算した。推定手順は前述した（2. 2. 2. 4）。根粒 1 g あたりの 1 年間のアセチレン還元量は $0.071 (0.069-0.072) \text{ mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$ (1996 年は $0.072 (0.069-0.073) \text{ mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$)

であった。窒素固定量に換算する際に換算比3を用いた場合、根粒1 gあたりの年間窒素固定量は0.66 (0.64-0.67) $\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$ (1996年は0.67 (0.65-0.68) $\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$) であった(表4-3)。また、換算比4を用いた場合、0.50 (0.48-0.50) $\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$ (1996年は0.50 (0.49-0.51) $\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$) であった。

2. 1節の幹の外側から周囲1 m以内の範囲で推定した各樹木個体の根粒バイオマスと dbh の関係から推定したこの林分の樹木個体あたりの根粒バイオマスの平均値は、1995年4月が77.5 g tree^{-1} (5.6 から199.2 g tree^{-1}) と推定された。1995年の関係式が1996年にも適応できると仮定した場合、1996年5月の根粒バイオマスは88.3 g tree^{-1} (6.5 から227.2 g tree^{-1}) となった。これらの値を用いると樹木個体あたりの年間平均窒素固定量は、換算比3の場合1995年が50.6 gN tree^{-1} (3.7 から126.6 gN tree^{-1})、1996年が58.5 gN tree^{-1} (4.3 から145.5 gN tree^{-1}) と推定された。換算比4の場合、1995年が38.0 gN tree^{-1} (2.8 から95.0 gN tree^{-1})、1996年が43.9 gN tree^{-1} (3.3 から109.1 gN tree^{-1}) と推定された。調査林分内の全個体の年間平均窒素固定量を合計し、調査地面積あたりに換算した結果、単位面積あたりの窒素固定量は、換算比3の場合56.4 $\text{kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (1996年は60.2 $\text{kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$)、換算比4の場合42.3 $\text{kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (1996年は45.2 $\text{kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) と推定された。

比較のため、モデル2とモデル3による1995年の計算結果(換算比3)を示した(表4-3)。相対着葉面積と根粒サイズによるモデル2では、根粒1 gあたりの1年間のアセチレン還元量は0.070 (0.068-0.071) $\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$ 、根粒1 gあたりの年間窒素固定量は0.65 (0.63-0.66) $\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$ 、樹木個体あたりの年間平均窒素固定量は49.9 gN tree^{-1} (3.7 から124.7 gN tree^{-1})、単位面積あたりの窒素固定量は55.6 $\text{kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ と推定された。土壌温度のみのモデル3では、根粒1 gあたりの1年間のアセチレン還元量は0.085 $\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$ 、根粒1 gあたりの年間窒素固定量は0.80 $\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$ 、樹木個体あたりの年間平均窒素固定量は61.0 gN tree^{-1} (4.4 から156.5 gN tree^{-1})、単位面積あたりの窒素固定量は68.0 $\text{kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ と推定された。モデル2ではモデル1の結果と大きな差を示さなかったが、モデル3では根粒1 gあたりのアセチレン還元量が約20%多く推定され、その結果単位面積あたりの窒素固定量も多く見積もられた。

2. 2. 3. 5 リターフォールによる窒素動態

ケヤマハンノキの樹冠上層部の生葉の窒素濃度は、開葉後すぐが最も高く ($4.01 \pm 0.12\%$)、8月には $3.29 \pm 0.15\%$ となり、9月以降葉齢と共に徐々に低下した。葉の窒素濃度は、樹冠の下層と上層で有意な差がなかった(下層の8月の値が $3.50 \pm 0.07\%$)。落葉の窒素濃度は、7月から8月と10

月から 11 月に生葉より有意に低かった。11 月には、樹冠上層の生葉 ($2.78 \pm 0.06\%$) と落葉の窒素濃度 ($2.56 \pm 0.03\%$) の差は、生葉の窒素濃度の 7.9% に相当した。また 8 月の生葉と落葉の窒素濃度を比較した場合、落葉時の窒素濃度の低下は生葉の 22.2% に相当した。

成長期間中のリターの平均窒素含量は、葉リター 2.75%、托葉 2.15%、枝と芽が 1.37%、繁殖器官 1.89% であった (表 3)。冬期以外のリターフォールによる窒素供給量の合計は 1995 年が $94.9 (\pm 3.56)$ $\text{kg ha}^{-1} \text{yr}^{-1}$ で 1996 年が $94.8 (\pm 4.02)$ $\text{kg ha}^{-1} \text{yr}^{-1}$ であった。葉リター中に含まれる窒素含量は 1995 年が $84.9 (\pm 2.11)$ $\text{kg ha}^{-1} \text{yr}^{-1}$ 、1996 年が $84.3 (\pm 2.49)$ $\text{kg ha}^{-1} \text{yr}^{-1}$ で、それぞれ全リターフォール中の 89.4% と 89.3% を占めた。1996 年の冬期のリターフォール中に含まれる窒素含量は $3.62 \text{ kg ha}^{-1} \text{yr}^{-1}$ であり、年間リターフォール中に含まれる窒素含量の 3.66% に相当した。葉リター中に含まれる窒素含量は、年間リターフォール中の 85.7% を占めた。

2. 2. 3. 6 葉リターの分解

リターバック内のケヤマハンノキの葉リターの重量は、12 月から 5 ヶ月間で初期値の 40% 減少した (図 7A)。葉リターの重量減少速度は 7 月から 9 月に上昇し、その後低下した。1 年間で初期重量の 70% が減少し、分解係数 k は 1.13 yr^{-1} であった。葉リターの窒素濃度は分解初期の 8 ヶ月間上昇し、窒素の不動化を示した (図 7A)。分解開始後 8 ヶ月から 10 ヶ月までは葉リターの窒素含量はほとんど変化せず、その後低下した。葉リター中の窒素含量の 12 月から 5 ヶ月間の減少量は、重量の減少割合より少なく、初期値の 25% であった。その後、葉リター中の窒素含量は重量と同様、もしくは、より速い速度で減少した。葉リターの C / N 比の初期値は 20 より低く、分解初期の 6 ヶ月間で 12 まで低下し、その後変化しなかった (図 7C)。初期の 1 年間で葉リター中の窒素含量は、初期の 58.4% が減少し、葉リターの分解により 1 年間で 45.8 kg ha^{-1} の窒素が土壌中へ供給された。

2. 2. 3. 7 林床有機物

林床の草本種のバイオマスは 8 月に最大になり ($2.4 \pm 0.76 \text{ ton ha}^{-1}$)、土壌の A₀ 層の有機物量は 8 月に最も少なくなった。8 月の林床有機物総量 (草本バイオマス + A₀ 層有機物) は、 6.9 ton ha^{-1} であり、草本バイオマスと A₀ 層有機物量の比は 1 対 2 であった。A₀ 層内では、2 mm 以上の有機物が 49.9%、2 mm 未満の有機物が 17.9%、枝が 31.6%、球果が 0.6% であった (図 8)。8 月の草本バイオマスと A₀ 層の窒素含量は 57.9 と 146.2 kg ha^{-1} であり、草本バイオマスの窒素含量は、林床有機物全体の 28.3% に相当した。A₀ 層内では、> 2 mm が 59.6%、< 2 mm が 21.4%、枝が 18.3%、球果

が 0.7%であった。

2. 2. 3. 8 土壌中の窒素蓄積量

土壌中の炭素と窒素濃度は、表層から 0 - 5 cm 深で最も高く（炭素 4.9%、窒素 0.4%）、5 - 10 cm で大幅に低下した（炭素 1.1%、窒素 0.09%）（図 9）。より深い土壌層では、炭素と窒素濃度は表層土壌の 10 分の 1 より低かった（炭素 < 0.6%、窒素 < 0.05%）。土壌層 0 - 100 cm までの炭素と窒素の蓄積量は、32.0 ton ha⁻¹ と 3.4 ton ha⁻¹ であり、窒素では約 30% が表層土壌（0 - 5 cm 深）に分布した。攪乱時の土壌の窒素濃度が、土壌層 30 cm 深の値（0.026%）と同じと仮定すると、土壌中の初期の窒素蓄積量は 2.0 ton ha⁻¹ となった。攪乱後の 21 年間（1975-1996）に 0 - 100 cm の土壌層中に蓄積された窒素量は 1.4 ton ha⁻¹ と推定された。21 年間の土壌中の窒素蓄積の増加量を道路建設からの年数で割って算出した結果、年平均窒素蓄積量は 66.7 kg ha⁻¹ yr⁻¹ と推定された。

2. 2. 4 考察

2. 2. 4. 1 ニトロゲナーゼ活性の季節変化

根粒 1 g あたりのニトロゲナーゼ活性（アセチレン還元活性; ARA）と樹木個体サイズの間には一貫した関連性はみられなかった（図 5）。被圧木の幹直径（dbh）増加率は、林冠を形成する樹木個体（林冠木）に比べて少なかった（図 2）が、被圧木の ARA は生育期間を通して林冠木と同程度の値を示した。しかし、樹木個体あたりの根粒バイオマスは、樹木個体サイズの増大に伴い増加した（2. 1 節, 図 9B）。これらの結果から、被圧木は根粒の活性によってではなく、樹木個体あたりの根粒バイオマスの違いにより、個体あたりの窒素固定量が林冠木に比べて少ないことが示唆された。

アクチノリザル植物のニトロゲナーゼ活性の季節変化にはいくつかの生物的・非生物的要因の相互作用が影響を及ぼす (Schwintzer et al. 1982)。この調査地で観察されたケヤマハンノキの ARA の季節変化とフェノロジーとの関係は冬期落葉性のアクチノリザル植物の典型的なものであり、同様の野外での ARA の季節変化は、他の多くの冬期落葉性のアクチノリザル植物 (*Alnus*, *Hippophae*, *Purshia*, *Myrica*) で報告されている (Schwintzer et al. 1982; Sharma et al. 2010)。4 月下旬、開葉前には土壌温度が 10°C 程度あっても ARA が検出されず、ARA が検出されるのは開芽後であった（図 4）。他の研究でも開芽前は土壌温度が 10 度以上でも活性を示さなかったことが報告されている (Huss-

Danell et al. 1992; Ekblad et al. 1994)。若い *Alnus incana* ではニトロゲナーゼ活性が個体サイズや総葉面積、光合成速度との間に正の相関関係が報告されている (Huss-Danell and Sellstedt 1983, Huss-Danell 1990)。ハンノキ属樹種の根粒による窒素固定は、葉から根粒へ供給される新たに生産された光合成生産物に依存している (Wheeler 1971) ことを裏付けるものであり、春にフランキアの vesicle が発達するための炭素化合物を生産するのに十分な葉面積が必要であることが示唆された。

夏期の ARA に年内でも年間でも大きなばらつきがあった。年間の ARA の変動理由として考えられるのは、2年間の繁殖器官の生産量の違いである。*Alnus glutinosa* の林分では果球の重量の増加は、雌雄花よりも早く始まる (Pizelle 1984)。この調査地では、ケヤマハンノキの果球の重量は花生産前の7月から8月にかけて増加した (Hasegawa and Takeda 2001)。さらに、繁殖器官の生産量には年間差があり、雌雄花の生産量は1996年のほうが1995年より多かった (Hasegawa and Takeda 2001, 2004)。幹の成長量は1996年のほうが1995年より少なかった (図2)。繁殖器官へのエネルギー (光合成生産物) 配分が多かったために、幹の成長への光合成生産物の配分が減少した可能性が考えられる。Pizelle (1984) は、20から30年生の *Alnus glutinosa* について、果実の発達が早い夏季にニトロゲナーゼ活性が低く、種の生産が終了した時期に、ニトロゲナーゼが上昇すると報告している。本調査地のケヤマハンノキ林分でも同様に、繁殖器官の成長が旺盛な8月に根粒と発達中の果実の間の競争により根粒への光合成生産物の配分が制限された可能性が考えられる。

また、葉が完全に開葉した夏季の ARA の変動の原因には気象条件による ARA の変動も考えられる (Huss-Danell 1988, 1990)。1995年の8月に ARA を3日間測定した。20日ぶりの雨の翌日に行った ARA の値は同じ月の他の測定日の値より高かった。ARA は乾燥ストレスにより低下することや (Sundström and Huss-Danell 1987; Hawkins and McDonald 1994; Sharma et al. 2010)、雨期に ARA が高いこと (Uliassi and Rogers 2002)、さらに ARA がその日の環境条件だけでなく、それまでの環境条件の両方に影響を受けることを指摘している (Huss-Danell 1992)。夏季に ARA の変動が大きかったのは測定日前後の乾燥と降雨が影響しているのかもしれない。

2. 2. 4. 2 林分内の窒素循環に対する窒素固定の寄与

本調査林分の窒素固定量は成長開始前の dbh の値を用いて計算した結果、換算比3の場合 $56.4 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (1996年は $60.2 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$)、換算比4の場合 $42.3 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (1996年は $45.2 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) と推定された。これらの結果は、これまでに報告されている林分あたりの窒素固定量である、数 $\text{kg N ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ から $320 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ という広範囲の値に含まれる結果であった (表5; Hibbs and

Cromack 1990; Huss-Danell 1990; Hurd and Schwintzer 1996; Hurd et al. 2001; Samborn et al. 2002; Sharma et al. 2002; Lee and Son 2005; Son et al. 2007)。

今回の林分当たりの窒素固定量の推定値は、葉リター中に含まれる窒素含量に対して、換算比 3 の場合 66.4% (1996 年は 71.4%)、換算比 4 の場合 49.8% (1996 年は 53.6%) に相当した (図 10)。また、葉リターの分解により 1 年間に土壤に放出される窒素量に対して、換算比 3 の場合 123.2% (1996 年は 131.4%)、換算比 4 の場合 92.4% (1996 年は 98.7%) に相当した。また、1996 年のデータに限られるが、林床の草本層に蓄積される窒素量の最大値に対して、換算比 3 の場合 104.0% (換算比 4 の場合 78.0%)、同じ時期の A₀ 層に蓄積される窒素に対して、換算比 3 の場合 41.2% (換算比 4 の場合 30.9%)、土壤中の推定年平均窒素蓄積量に対して、換算比 3 の場合 90.3% (換算比 4 の場合 67.7%) に相当した。

他の研究例では、例えば、稚樹では、2 年間の測定で、窒素固定による窒素の 45% が葉リターの窒素と土壤窒素の増加に寄与していた (Huss-Danell 1992a)。また 3 年生未満の若い *Alnus incana* 林分では、高緯度でも高い窒素固定速度を示し、窒素不足の立地における肥沃度の改善に貢献していた (Huss-Danell et al. 1992b)。窒素固定植物の存在により土壤の全窒素量 (van Cleve et al. 1993; Wurtz 1995; Rhoades et al. 2001; Myrold and Huss-Danell 2003) や可給態窒素量 (Rhoades et al. 2001; Myrold and Huss-Danell 2003) が増加する。また、lodgepole pine の葉の窒素含量と成長を sitka alder が改善した (Brockley and Sanborn 2003)。Vogel and Gower (1998) は、jack pine の枝や葉の窒素含量が、ハンノキ属樹種との混植地で高くなることを示した。

Sharma and Ambasht (1988) は、*Alnus nepalensis* の林齢が 7 年生から 56 年生の増加する間に、年間窒素固定量が 117.29 kg ha⁻¹ から 29.05 kg ha⁻¹ に減少し、窒素吸収量に占める窒素固定量の割合が 33% から 11% に低下することを示した。本調査地では、ケヤマハンノキの窒素吸収量は測定していないが、林分のリターフォール中に含まれる窒素量 (98.42 kgN ha⁻¹ yr⁻¹; 1996 年) に対して、窒素固定量は 61.2% (換算比 4 の場合 45.9%) の値に相当した。*Alnus nepalensis* の人工林では、7 年、17 年、30 年、46 年、56 年生林分の窒素吸収量に対して、リターフォールにより土壤へ供給される窒素の割合が約 35%、54%、57%、59%、56% であった (Sharma 1993; Sharma and Ambasht 1988)。仮にケヤマハンノキの窒素吸収量に対するリターフォール中の窒素の値にこれらの値 (35% から 59%) を用いると、窒素吸収量は 166.8 kgN ha⁻¹ yr⁻¹ から 281.2 kgN ha⁻¹ yr⁻¹ と仮定され、本調査地での窒素吸収量に対する窒素固定の寄与率は 19.6% から 33.1% (換算比 4 の場合; 14.7% から 24.8%) と推定できる。窒素固定量が葉リター中に含まれる窒素の半分以上に相当することが推定されたことと併せて考える

と、今回対象とした約 18 年生のケヤマハンノキ林分では、依然として、林分内の窒素循環における窒素固定の貢献度は大きいことが明らかになった。他のアクチノリザル植物 (ヤマモモ属) の結果では、土壌中の窒素が増加し、窒素固定への依存度が低下すると、樹木個体サイズの増大に対して根粒バイオマスの増加が伴わなくなった (Vitousek and Walker 1989)。本調査値では、ケヤマハンノキの根粒バイオマスは、dbh の増加に伴い増加し、両者の間に相対成長の関係が保たれていた (2.1 節; 図 9B) ことから、本調査地のケヤマハンノキ林分の窒素経済において窒素固定は依然として寄与をしていることが示唆された。

2. 2. 4. 3 林分内の窒素循環

ケヤマハンノキ林分内の窒素循環の各項目について見てみる。葉リターによる養分供給量は、多くの森林生態系において再循環する養分量の 50 から 80% に相当する (Vitousek 1982)。調査した 2 年間でリターフォール量にほとんど差がなく (表 2)、葉リター量は報告されているハンノキ属樹種の他の林分の値 (Tadaki et al. 1987) と同程度であった (表 6)。

老化前に葉から養分を転流させることは、養分の損失の減少 (Chapin 1980) や養分利用効率の増加 (Vitousek 1982; Enoki 1999) により貧栄養な土壌に順化するための重要な戦略の一つである。窒素固定能を持たない落葉広葉樹の単位葉重量あたりの窒素再吸収効率は 33% から 66% と報告されている (Kramer and Kozlowski 1979; Yasumura et al. 2006)。ケヤマハンノキの秋の落葉時の単位葉重量あたりの窒素再吸収効率は夏の成熟葉の窒素濃度 (3.5%) との比較で算出した場合 22.2% とこれらの値に比べて低かった。ケヤマハンノキは生葉の窒素濃度が高いため、葉リター中に含まれる窒素含量はこの林分の全リターの約 90% を占めた (表 3)。ハンノキ属樹種の秋の落葉時の窒素再吸収効率が低いことは *A. firma* (Tateno 2003) や *A. glutinosa* (Dawson and Funk 1981) でも報告されている。ハンノキ属樹種は、他の窒素固定能を持たない落葉広葉樹に比べて窒素再吸収効率が低いため、秋の時期の葉の窒素含量が高く維持され、光合成能力の低下が少ないと考えられる (Tateno 2003)。このような性質は、秋の時期の根粒への光合成産物の供給を維持し、窒素固定活性をある程度高く保つことに関連することが示唆された (図 4)。また、落葉前の窒素再吸収効率が低いことにより窒素含量の高い落葉を土壌に供給することになる。このようなハンノキ属樹種の特性は土壌への窒素蓄積の促進に貢献すると考えられる。

土壌に供給された葉リターの分解は初期の 5 - 6 ヶ月間、窒素濃度が上昇し窒素不動化の段階を示したが、純不動化ではなく、葉リターに含まれる総窒素量は初期値から減少した (図 7A)。葉リタ

一の C / N 比が初期の約 20 から無機化段階を示す C / N 比が 12 (Takeda 1998) に低下し、その後、C / N 比 12 を維持するように炭素と窒素含量が減少したことから (図 7B)、ケヤマハンノキの葉リターの分解段階が速やかに無機化の段階へ移行したことが示唆された。葉リターの窒素無機化は、冷温帯から温帯域の針葉樹では C / N 比が 30 から 40 で始まり、熱帯域の広葉樹では C / N 比が 35 から始まると考えられている (Cromack et al. 1975; Lousier and Parkinson 1978; Takeda 1998)。これまでも、ハンノキ属樹種の葉リターの分解速度が、他の窒素固定能を持たない落葉広葉樹種より早いことが報告されている (表 7; Bocock 1964; Van Cleve et al. 1971; Edmonds 1980; Sharma and Ambasht 1987; Tayler et al. 1989b; Sharma et al. 2008)。本研究の分解実験でも、ケヤマハンノキの葉リターの窒素は速い分解速度により速やかに土壌へ供給されることが明らかになった。

林床の草本種バイオマスは、葉リターの分解速度が最も速い時期に最大になり、葉リターで減少した窒素と同程度の窒素を含んでいることがわかった。これらの結果から、林床の草本植生は、この林分から窒素が溶脱することを一時的に防ぎ、土壌中への窒素蓄積を促進する役目を演じている可能性が示唆された。また、林床草本中の窒素含有量の最大値、が窒素固定量と同等の量である点も興味深い結果である (図 10)。

冷温帯林の A₀ 層の有機物量は 10.4 ton ha⁻¹ (Iwatsubo 1996)、温帯落葉広葉樹林の B_D 型土壌と B_B 型土壌の A₀ 層の窒素含有量はそれぞれ 0.10 ton ha⁻¹ と 0.38 ton ha⁻¹ (Tsutsumi 1987) と報告されている。本研究のケヤマハンノキ林分の A₀ 層における有機物と窒素の蓄積量 (6.9 ton ha⁻¹, 0.20 ton ha⁻¹) は、他の温帯落葉広葉樹林に比べて少なかった。リターフォール量に対する林床有機物量の比は 1.83 (1996 年は 1.78、冬期を含めると 1.68) であった。草本種のバイオマスを含めると 2.47 (1996 年は 2.40、冬期を含めると 2.26) であった。林床における有機物蓄積速度は、ヒラヤマの *Alnus nepalensis* に比べると遅かった (7 年生から 56 年生林分の結果で 3.36 から 5.59) (Sharma and Ambasht 1986)。

この調査地の鉍物質土壌では、土壌攪乱後の約 18 年間に炭素と窒素の蓄積が生じていたが、その蓄積は土壌表層 (0 - 5 cm) に限られた (図 8)。温帯落葉広葉樹林では、土壌の窒素濃度は斜面上部では、表層の約 1.0% から 0.6 m 深の 0.3% まで低下し斜面の下部では表層土壌の約 0.4% から 0.6 m 深の 0.1% まで低下した (Iwatsubo 1996; Tsutsumi 1989)。この林分では、0 - 1 m 深の土壌中の炭素と窒素蓄積量は 32.0 ton C ha⁻¹ と 3.4 ton N ha⁻¹ であった。温帯落葉広葉樹林の B_D 型土壌と B_B 型土壌では、鉍物質土壌層の炭素と窒素の蓄積量は、それぞれ、90.3 ton C ha⁻¹、7.46 ton N ha⁻¹ と 75.5 ton C ha⁻¹、4.30 ton N ha⁻¹ であり (Tsutsumi 1989, 表層から 0.7 m 深までの値)、この林分の炭素と窒素の蓄積量は、まだ少ないと考えられる。

ハンノキ属樹種の特徴の一つに、葉が虫による被食を受けやすいことが挙げられる (Kikuzawa et al. 1979; Tadaki et al. 1987)。節足動物による被食により、地上部の純一次生産量の 10 - 20% が消費されると考えられている (中央値 18%, $n = 69$, Cyr and Pace 1993)。植食性の昆虫等の被食の結果、糞の形態で林冠から土壌へかなりの量の窒素が供給される (Meehan and Lindroth 2007)。虫糞による供給される窒素は、通常、成長期間中にピークを持ち、可溶性の形態である (Lovett and Ruesink 1995)。そのため、虫糞により土壌に供給された窒素は、微生物によりすぐに取り込まれたり、植物により吸収されたり、または、降雨イベントの間に系外へ流出する場合もある (Frost and Hunter 2007)。本研究では、サンプル回収の間隔が 1 ヶ月であったため、糞の回収率は Tadaki et al. (1987) の 72% より高いことが予想される。この 72% は糞専用のトラップに比べて通常のトラップを使用した際に、28% 回収率が低下することから算出されている。本研究では回収率の低下が 5% と仮定し (Tadaki et al. 1987)、被食量の 50% が糞となると仮定した (Kikuzawa et al. 1979; Watanabe 1980; Kimura 1982) 場合、葉の被食量は $220.0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ (1996 年は $186.8 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) と推定された。被食された推定葉量を加えると、林分のリター量は 2 年とも $3.28 \text{ ton ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ となり、被食量は葉リター量の 6.7% (1996 年は 5.7%) に相当した。ケヤマハンノキに対する被食圧は、大気中の CO_2 濃度が上昇した場合に変化するかもしれない (Koike et al. 2006) ため、この虫糞量のデータは有効な情報を提供すると考える。

2. 2. 4. 4 ニトロゲナーゼ活性の推定方法

ニトロゲナーゼ活性に影響を及ぼしうる要因は、植物や根粒の齢、生育環境条件、窒素固定活性の測定方法、短期的な測定を行う際の一日の間の時間や季節、活性速度の表現方法など、さまざまである。現実的には、これら多くの要因の影響により活性が変動するためニトロゲナーゼ活性の真値を決めることはほとんど不可能である (Huss-Danell 1990)。そのためニトロゲナーゼ活性の推定、さらには、窒素固定量の評価には、多くの仮定が必要となる。本研究の窒素固定量の推定も多くの仮定のもとに行っている。その一つがアセチレン還元量と窒素固定量の換算比である。先述したように換算比は理論的には 3 対 1 である。アセチレン還元法は、窒素固定を過小評価することがアクチノリザル植物でない窒素固定樹種 (Minchin et al. 1983, 1986) とアクチノリザル植物 (Schwintzer and Tjepkema 1997) の両方で報告されている。アセチレン (C_2H_2) 還元の際には生じないが、窒素 (N_2) 還元の際に、ニトロゲナーゼを通過する電子の流れが H^+ を H に還元するために利用される。このため N_2 と C_2H_2 還元の比が 1 対 3 よりも有意に大きくなることが予想される (Winship and Tjepkema 1990)。 N_2 と C_2H_2 還元の換算比は広範囲にばらついているが、通常、換算比は 1 対 3.5 から 1 対 4.0

の範囲が普通である (Silvester 1983)。しかし、これらの換算比はアセチレンを導入する事によるニトロゲナーゼ活性の低下が知られる前の値であるため (Schwintzer and Tjepkema 1997)、アセチレン還元速度自体が過小評価になっている可能性がある (Winship and Tjepkema 1990)。さらに、前節 (2.1 節) で示したように、樹木個体あたりの根粒バイオマスを幹の周囲 1 m に限った範囲から推定した点も主な過小評価要因の 1 つである。

ニトロゲナーゼ活性の推定にモデル 1 (相対着葉面積、根粒サイズ、土壌温度) とモデル 2 (相対着葉面積、根粒サイズ) を用いた場合の結果は、ほとんど差がなかった (表 4)。この結果は、土壌温度の項を入れなくても推定結果に差が生じないことを意味する。実際、解析結果でも、最終的に土壌温度の項が削除されたモデル 2 が選択された。しかし、モデル内で環境要因を表す項目は土壌温度のみであるので、環境が変化した場合のニトロゲナーゼ活性の推定に対応するためにも土壌温度の項目を含む方が望ましいと考える。一方、モデル 3 (土壌温度のみ) では、モデル 1 に比べて根粒 1 g あたりの窒素固定量 (アセチレン還元量) が約 20 % 多く推定された (表 4)。このモデルでは、アセチレン還元活性の測定に用いた根粒サイズの違いが、ARA と土壌温度との関係に影響を及ぼす可能性が高い。また、季節ごとの Q_{10} の変化の考慮も必要になると考える。

本研究では、根粒サイズを考慮する必要性を示した。しかし、実際に毎回根粒サイズの分布を明らかにし、窒素固定量の推定を行うことは現実的でないかもしれない。根粒サイズがニトロゲナーゼ活性に影響を及ぼすことから、測定時に用いるサンプルの根粒サイズに注意を払う必要があるだろう。窒素固定量の推定誤差を少なくするために、できるだけ多くのサンプルで測定を行う、もしくは、平均的な根粒サイズを明らかにし、そのサイズに近い根粒を用いてアセチレン還元活性の測定を行うことが推奨される。

2. 2. 4. 5 まとめ

窒素固定活性は、葉の展開とともに上昇し、着葉量・地温ともに最大となる 8 月に最も高く、全て落葉した 12 月には活性がなかった。宿主の成長パターンとの関連が見られた。樹木個体サイズ間の窒素固定活性の違いは不明瞭であった。窒素固定活性を、微生物の活動を制御する地温と、窒素固定のエネルギー供給源となるヤマハンノキの着葉量、根粒のサイズにより推定した結果、換算比 3 を用いた場合、窒素固定量は $56.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ と推定された (換算比 4 の場合 $42.3 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)。この値は、年間の葉リター中の窒素量の 66.4% (換算比 4 の場合 49.8%) に相当した。ケヤマハンノキがこの林分において窒素要求量の大きな部分を窒素固定に依存していることが明らかになった。また、

落葉時の低い窒素引き戻し率、葉リターの速い分解を通じて、ヤマハンノキにより固定された窒素の一部は、速やかに土壤に供給されており、まだ表層に限られるものの、約 18 年間に、生物窒素固定が土壤の肥沃化に貢献していることが明らかになった。

表1 ケヤマハンノキのフェノロジー。葉面積 (leaf area, m²)、当年枝伸長 (current shoot length, cm)、幹の胸高直径 (stem diameter, mm)、根粒の粒長 (nodule length, mm)、雄花序長 (male flower length, mm)、雌花序長 (female flower length, mm)。単純ロジスチック式のパラメータ。tm: 最大の成長速度を示す日 (DOY)、λ: 増加速度、t (0.1 max): 各パラメータの最大値の 0.1 に達する日 (DOY)、t (0.9 max): 各パラメータの最大値の 0.9 に達する日 (DOY)

		λ	tm	t (0.1 max)	t (0.9 max)
leaf area	m ²	0.067	169.6	136.7	202.4
current shoot length	cm	0.063	167.5	132.9	202.2
stem diameter	mm	0.048	190.7	144.9	236.6
nodule length	mm	0.073	211.5	181.5	241.5
male flower length	mm	0.080	244.8	217.3	272.3
female flower length	mm	0.076	244.7	215.7	273.7

表2 ケヤマハンノキ林分におけるリターフォール量 (1995年; 4月21日から12月1日, 1996年; 5月5日から12月6日)。ケヤマハンノキの葉 (Leaves (alder))、枝 (Branches)、托葉 (Stipules)、花器官 (Flowers)、他の樹種の葉 (Leaves (other spp.))、虫糞 (Insect feces)、その他 (Others)。1996年には、冬期間のリターフォールも調べた (12月6日から1997年5月9日)。括弧内の値は各年内の総リターフォール量に対する割合を示す

Litter component	1995 (21.Apr - 1.Dec)		1996 (9.May - 6.Dec)		6.Dec 1996 - 9. May 1997
	(kg ha ⁻¹)	(%)	(kg ha ⁻¹)	(%)	(kg ha ⁻¹)
Leaves (alder)	3065	(81.4)	3097	(80.0)	-
Branches	246	(6.5)	458	(11.8)	152
Stipules	121	(3.2)	111	(2.9)	-
Flowers	101	(2.7)	42	(1.1)	81
Leaves (other spp.)	118	(3.1)	59	(1.5)	0
Insect feces	105	(2.8)	89	(2.3)	0
Others	11	(0.3)	14	(0.4)	5
Total	3767	(100)	3870	(100)	238

表3 ケヤマハンノキ林分におけるリターフォール中の窒素含量 (1995年; 4月21日から12月1日, 1996年; 5月5日から12月6日)。ケヤマハンノキの葉 (Leaves (alder))、枝 (Branches)、托葉 (Stipules)、花器官 (Flowers)、他の樹種の葉 (Leaves (other spp.))。括弧内の値は各年内の総リターフォール量に対する割合を示す。それぞれの項目の窒素含量の平均値を示した

Litter component	1995 (21.Apr - 1.Dec)		1996 (9.May - 6.Dec)		N content (%)
	(kg ha ⁻¹)	(%)	(kg ha ⁻¹)	(%)	
Leaves (alder)	84.9	(89.4)	84.3	(88.9)	2.75
Branches	3.4	(3.5)	6.2	(6.6)	1.37
Stipules	2.6	(2.7)	2.4	(2.5)	2.15
Flowers	1.9	(2.0)	0.8	(0.8)	1.89
Leaves (other spp.)	2.1	(2.3)	1.1	(1.1)	1.83
Total	94.9	(100)	94.8	(100)	

表4-1 ケヤマハンノキの根粒のニトロゲナーゼ活性 (アセチレン還元活性; ARA) の推定に用いたモデル

モデル1	$ARA = \exp(1.12 + 0.033[cr-LA] - 0.247 [\text{nodule diameter}] + 0.036 [\text{soil temperature}])$
モデル2	$ARA = \exp(1.44 + 0.037 [cr-LA] - 0.248 [\text{nodule diameter}])$
モデル3	$ARA = \exp(-7.61) * [\text{soil temperature}]^{3.83}$

表4-2 モデル1とモデル2の解析結果

	モデル1	モデル2
Null Deviance	698.2	698.2
Residual Deviance	466.7	467.7
AIC	3082.8	3082

表 4-3 ケヤマハンノキの根粒あたり、樹木 1 個体あたり、林分あたりの窒素固定量の推定結果 (1995 年)。モデル 1 (相対着葉面積 (*cr-LA*)、根粒サイズ、土壤温度)、モデル 2 (相対着葉面積 (*cr-LA*)、根粒サイズ)、モデル 3 (土壤温度)、それぞれを用いたときの計算結果を示した。アセチレン還元活性と窒素固定活性の換算比を 3 : 1 と 4 : 1 の両方の計算結果を示した。根粒 1 g あたりの窒素固定量 ($\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$)、樹木個体あたりの窒素固定量 ($\text{gN tree}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)、林分内の全個体の窒素固定量の合計値 ($\text{kgN all trees}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)、単位面積あたりの窒素固定量 ($\text{kgN ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)を示した。根粒 1 g あたりと樹木個体あたりの値では、括弧内に林分内の最大値と最小値を示した。調査林分の面積は 0.105 ha、立木密度は 1114 ha^{-1} (1995 年 4 月)である。樹木個体あたりの根粒バイオマスは、 $[\text{根粒バイオマス}] = 0.442 [\text{dbh}]^{2.01}$ 、により推定した (2. 1 節, 図 9B)

	モデル1 (Cr-LA, 根粒サイズ, 土壤温度)	モデル2 (Cr-LA, 根粒サイズ)	モデル3 (土壤温度)
換算比 3 : 1			
根粒1 gあたりの窒素固定量 ($\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$)	0.66 (0.64 - 0.67)	0.65 (0.63 - 0.66)	0.80
樹木個体あたりの窒素固定量 ($\text{gN tree}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)	50.6 (3.7 - 126.6)	49.9 (3.7 - 124.7)	61.0 (4.4 - 156.5)
林分内全個体の総窒素固定量 ($\text{kgN all trees}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)	5.9	5.8	7.1
単位面積あたりの窒素固定量 ($\text{kgN ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)	56.4	55.6	68.0
換算比 4 : 1			
根粒1 gあたりの窒素固定量 ($\text{gN g}^{-1} \text{ nodule yr}^{-1}$)	0.50 (0.48 - 0.50)	0.49 (0.48 - 0.50)	0.60
樹木個体あたりの窒素固定量 ($\text{gN tree}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)	38.0 (2.8 - 95.0)	37.4 (2.7 - 93.5)	45.7 (3.3 - 117.4)
林分内全個体の総窒素固定量 ($\text{kgN all trees}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)	4.4	4.4	6.9
単位面積あたりの窒素固定量 ($\text{kgN ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$)	42.3	41.7	65.4

表5 ハンノキ属樹種の推定年間窒素固定量

Species	N ₂ fixation (kgN ha ⁻¹ yr ⁻¹)	age	tree density (tree ha ⁻¹)	References
<i>Alnus hirsuta</i>	55	18	1114	this study
<i>Alnus hirsuta</i>	46.6	27	1960 (mixed with Pinus 370)	Son et al. (2007)
<i>Alnus hirsuta</i>	41.1	27	1130 (mixed with Pinus 1130)	Son et al. (2007)
<i>Alnus hirsuta</i>	60	38	700	Lee and Son (2005)
<i>Alnus crispa</i>	20			Binkley (1981)
<i>Alnus glutinosa</i>	58	5-20		cited by Binkley (1981)
<i>Alnus incana</i>	43	30		Johnsrud (1978)
<i>Alnus incana</i>	85-115	6-7		Rytter (1991)
<i>Alnus incana</i>	37			Hurd et al. (2001)
<i>Alnus incana</i> spp. <i>rugosa</i>	85			Voigt and Stuecek (1969)
<i>Alnus incana</i> spp. <i>rugosa</i>	170			Daly (1966)
<i>Alnus incana</i> spp. <i>rugosa</i>	5			Younger and Kapustka (1983)
<i>Alnus incana</i> spp. <i>rugosa</i>	1-4		mixed with Popula	Younger and Kapustka (1983)
<i>Alnus incana</i> spp. <i>rugosa</i>	37			Hurd et al. (2001)
<i>Alnus incana</i> spp. <i>tenuifolia</i>	38			Schimel (1998)
<i>Alnus incana</i> spp. <i>tenuifolia</i>	20	2		Huss-Danell (1992)
<i>Alnus nepalensis</i>	117	7	715	Sharma and Ambasht (1988)
<i>Alnus nepalensis</i>	29	56	435	Sharma and Ambasht (1988)
<i>Alnus nepalensis</i>	52-155	5-40	mixed with Amomun	Sharma et al. (2002)
<i>Alnus nepalensis</i>	57-155	5-40	mixed with Amomun	Sharma et al. (2010)
<i>Alnus rubra</i>	300	30		Zavitkovski and Newton (1968)
<i>Alnus rubra</i>	62	2-4	5000-8000	Tripp (1979)
<i>Alnus rubra</i>	62-85	5	2000-10000	Bormann and Gordon (1984)
<i>Alnus rubra</i>	22	2	10000	Kim (1990)
<i>Alnus rubra</i>	75-85	55	3000	Binkley (1992)
<i>Alnus rubra</i>	130	15-20	mixed with Pseudotsuga	Binkley (1981)
<i>Alnus rubra</i>	320	2-15		Newton (1968)
<i>Alnus rubra</i>	23	2		Kim et al. (1989)
<i>Alnus rubra</i>	85	1-38		Cole et al. (1978)
<i>Alnus rubra</i>	80	1-4		DeBell and Radwan (1979)
<i>Alnus rubra</i>	100	10-40		Bowman and Debell (1981)
<i>Alnus rubra</i>	42	1-23		Binkley (1982)
<i>Alnus rubra</i>	65	1-23		Binkley (1982)
<i>Alnus sinuata</i>	35	5		Binkley (1982)
<i>Alnus sinuata</i>	20	2		Binkley (1981)
<i>Alnus sinuata</i>	2-15			Mead and Preston (1992)
<i>Alnus sinuata</i>	2-15			Sanborn et al. (2002)
<i>Alnus viridis</i>	15			Binkley (1981)
<i>Alnus viridis</i>	6			Moirond and Capellano (1979)
<i>Alnus</i> spp.	20-130		mixed	Binkley (1992)

表6 ハンノキ属樹木の林分におけるリターフォール量

Species	Location	Total litterfall (ton ha-1)	Leaf litterfall	References
<i>Alnus hirsuta</i>	Japan	4.11	3.06	this study
<i>Alnus glutinosa</i>	Oregon	4.5-9.9	3.6-6.6	Zavitkovski and Newton (1968)
<i>Alnus incana</i>	Washington	5.5	4.2	Gessel and Turner (1974)
<i>Alnus incana</i>	Himalaya	3.2-5.8		Sharma and Ambasht (1987)
<i>Alnus incana</i>	Alaska		2.6	Crocker and Major (1955)
<i>Alnus nepalensis</i>	Hungary	3.3		Bray and Gorham (1964)
<i>Alnus nepalensis</i>	Canaada	5.5		Daly (1966)
<i>Alnus rubra</i>	Sweden		2.5-3.9	Rytter et al. (1989)
<i>Alnus rubra</i>	Japan	3.7	3.2	Asai (1974)
<i>Alnus rubra</i>	Japan		3.1-3.8	Kikuzawa et al. (1984)
<i>Alnus rubra</i>	Japan	4.3-5.7	2.8-3.7	Mori (1981)
<i>Alnus rubra</i>	Japan		2.6	Tadaki and Shidei (1960)

表7 ハンノキ属樹木の林分における落葉の分解速度。分解係数 (k) 値、もしくは、一定期間 (年間など) の分解速度を示す。

Species	k / year	decomposition rate	References
<i>Alnus hirsuta</i>	1.13	70 % / yr	this study
<i>Alnus crispa</i>	0.251	95 % / 11.5 yr	Taylor et al. (1989b)
<i>Alnus crispa</i>		55 % / yr	Van Cleve et al. (1971)
<i>Alnus glutinosa</i>		70-90 % / 8 month	Bocock (1964)
<i>Alnus nepalensis</i>		46-61 % / yr	Sharma and Ambasht (1987)
<i>Alnus nepalensis</i>	0.56-0.94	46-67 % / yr	Sharma et al. (2008)
<i>Alnus rubra</i>		55 % / yr	Edmonds (1980)

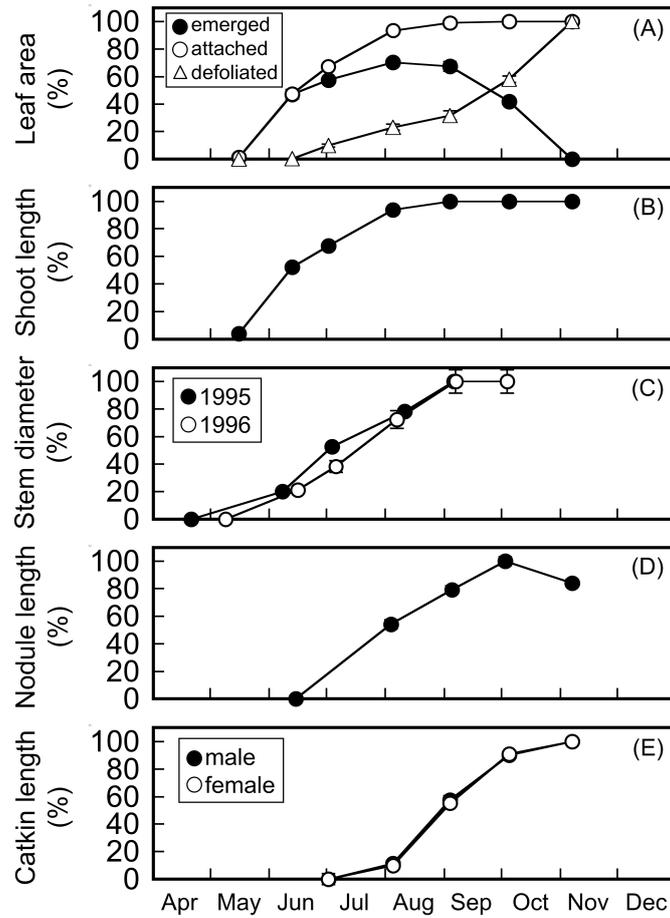


図 1. ケヤマハンノキの成長様式。当年枝当たりの着葉（黒丸）・落葉（三角）・総出現葉（白丸）面積（A）、当年枝伸長量（B）、胸高直径成長量（C, 1995 年（黒丸）と 1996 年（白丸））、根粒の粒長（D）、雌（白丸）雄（黒丸）花序の長さ（E）。平均値と標準誤差を示す（A, B: $n = 93$, C: $n = 50$, D: $n = 156$ ）

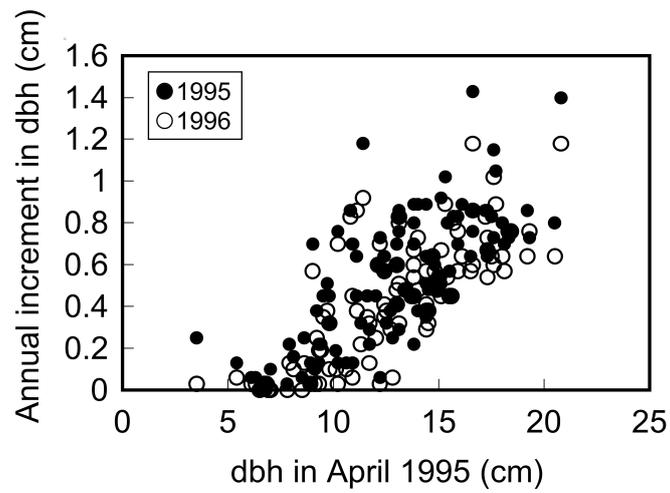


図2. ケヤマハンノキの胸高直径 (dbh) の年間増加量。黒丸 1995年、白丸 1996年

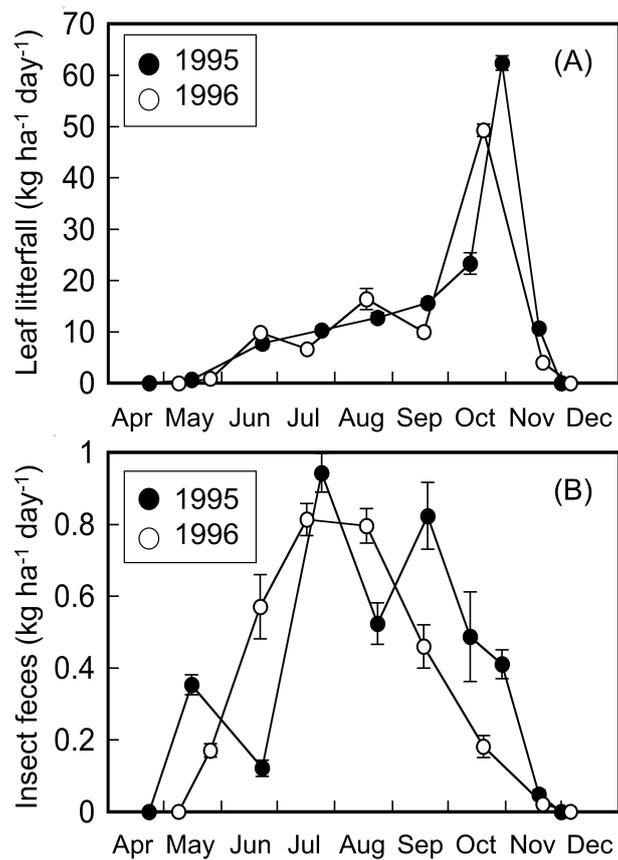


図3. ケヤマハンノキ林分内のリターとラップで回収された葉リター量と虫糞リター量の季節変化。平均値と標準誤差を示す ($n=10$)。黒丸 1995年、白丸 1996年

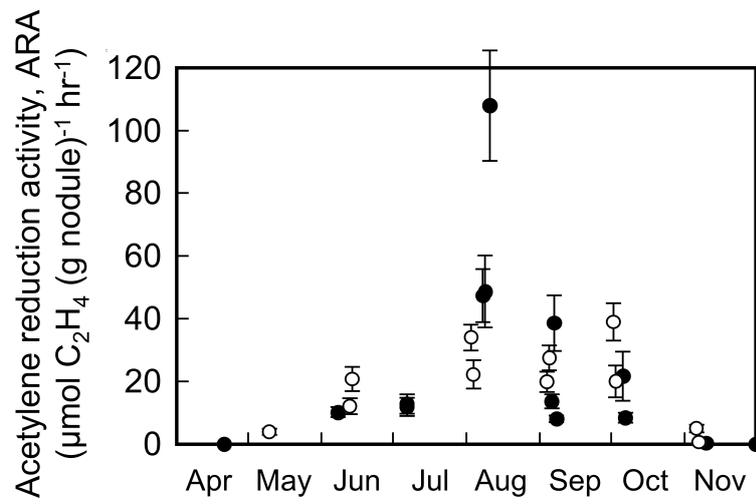


図 4. 野外条件でのケヤマハンノキの根粒のアセチレン還元活性 (ARA) の季節変化。平均値と標準誤差を示す (1995 年は $n = 6 - 18$, 1996 年は $n = 6 - 20$)。黒丸 1995 年、白丸 1996 年。1995 年の 4 月と 12 月には ARA が検出されなかった

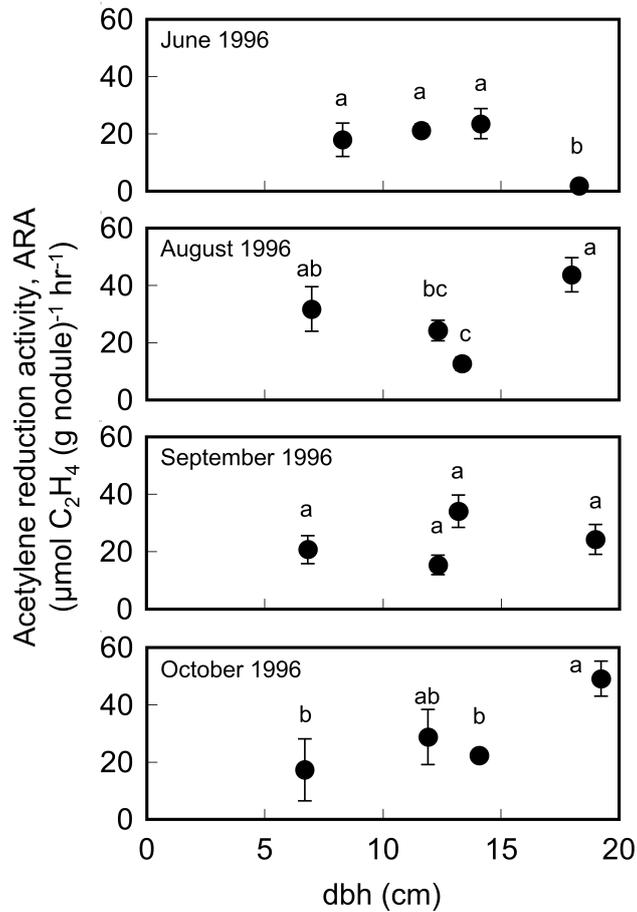


図 5. 樹木個体サイズ (dbh) と根粒のアセチレン還元活性 (ARA) の関係 (1996 年 6 月から 10 月)。平均値と標準誤差を示す。各月のグラフの最も小さいサイズの個体は被圧木を示す。異なる文字は個体サイズ間で有意に異なることを意味する ($P < 0.05$) (Tukey-Kramer test)

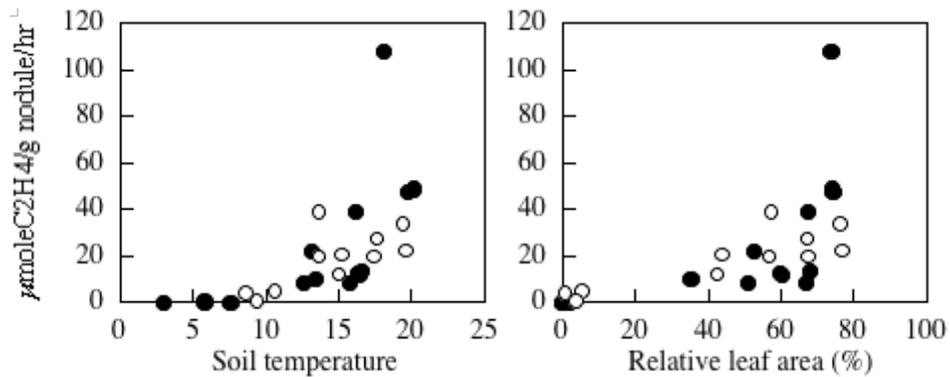


図 6. ケヤマハンノキ林分のアセチレン還元活性 (ARA; $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ nodule hr}^{-1}$) と 10 cm 深の土壤温度 (左図)、相対着葉面積 (右図) の関係。ARA は各測定日の平均値を示す。白丸 1995 年、黒丸 1996 年

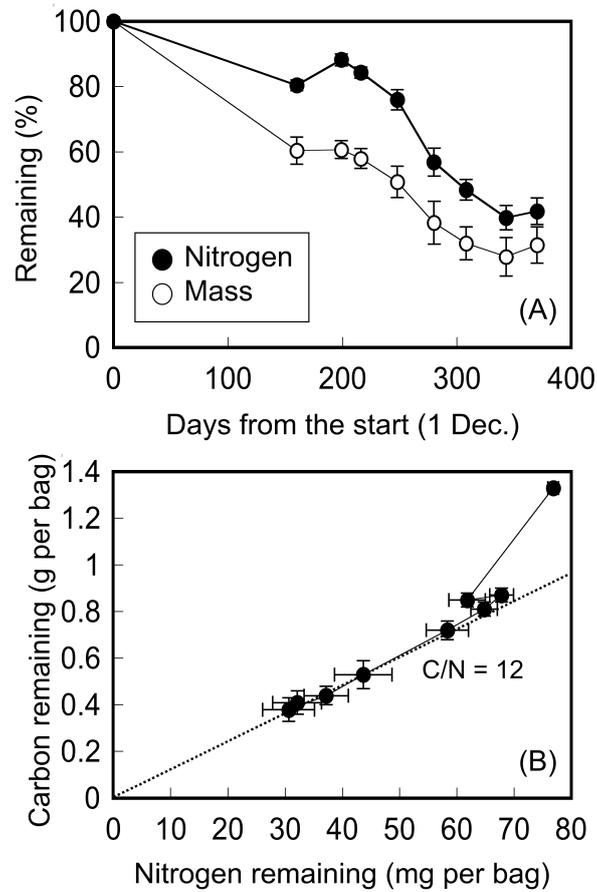


図 7. 調査地でのケヤマハンノキの葉リターの重量 (白丸 mass) と窒素含量 (黒丸 nitrogen) の分解に伴う変化 (A)。初期値を 100% として示す。ケヤマハンノキ葉リター中の窒素含量 (Nitrogen remaining) と炭素含量 (Carbon remaining) の変化 (B)。破線は、C / N 比 = 12 の線を示す。いずれも調査地の平均値と標準偏差で表す ($n = 10$)

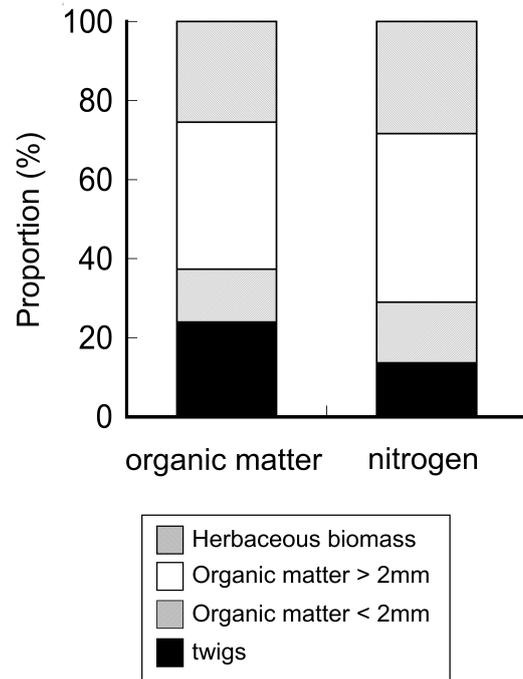


図 8. 8 月の下層草本植生と林床有機物のバイオマスと窒素含量。林床有機物は枝、2 mm 以上の有機物と 2 mm 以下の有機物で区分した

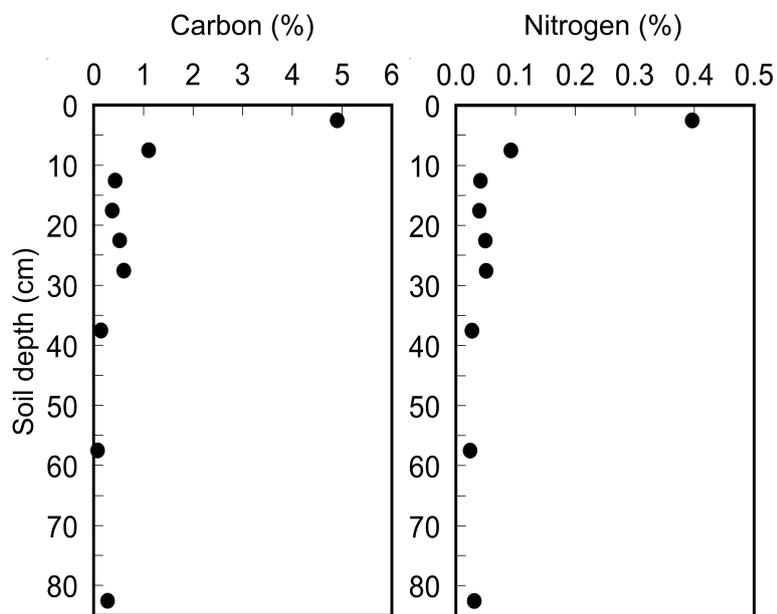


図 9. ケヤマハンノキ林分における土壌中の炭素濃度（左図）と窒素濃度（右図）の垂直分布

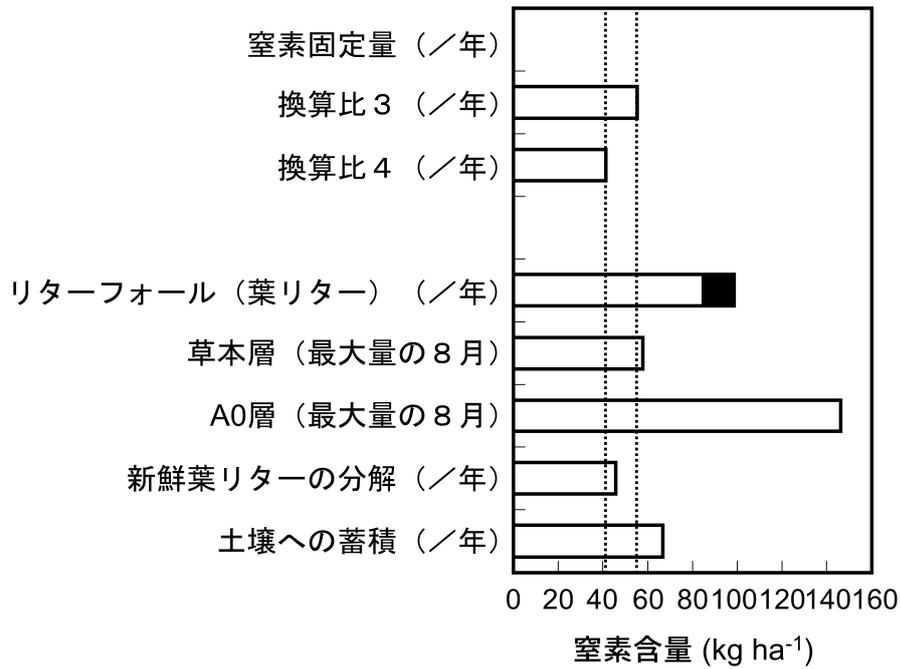


図 10. ケヤマハンノキ林分における窒素循環。推定した窒素固定量は、換算比 3 と 4 の両方の値を示した。リターフォールの棒グラフは、白い部分が葉リター、黒い部分が冬期リターを含む葉以外のリターを表す。図中の点線は、窒素固定量の値（換算比 3 と 4 の両方）との比較のために示した

2. 3 林床の更新樹種の空間分布様式

2. 3. 1 背景

土壌中の窒素供給量による植物の成長の制限は広範に存在するため (Vitousek and Howarth 1991)、植物群集の形成や生態系機能に影響を及ぼす窒素固定の役割は大きい (Thomas and Bowman 1998; Chapin et al. 1994)。植物群集の発達中に窒素固定を通じて土壌中の窒素量が増加することにより、遷移後期の種の侵入が誘導・促進され、遷移の進行も促進される (Thomas and Bowman 1998)。また、ハンノキ属樹木を針葉樹と混交させることにより、土壌の肥沃化に加えて林床植生の多様性を高める効果があることも注目されている (Hanley et al. 2006)。植物による種間の促進作用 (interspecific facilitation) も、植物群落の形成や生態系機能において重要である (Hunter and Aarssen 1988; Callaway and Walker 1997)。例えば、共生窒素固定能を持つマメ科植物のシロツメクサの例では、近接して成長する植物種の量や成長に影響を及ぼした (Thomas and Borman 1998)。ただし、種による反応の違いがあり、シロツメクサの分布と正の相関を示す植物種と負の相関を示す植物種が存在しており、窒素固定植物の存在が森林の群集構造や一次生産量における空間的な不均一さに重要な影響を及ぼしていることが示唆されている (Thomas and Borman 1998)。もし窒素固定樹種であるケヤマハンノキの存在が、周囲に更新してくる植物の多さに影響を及ぼすとしたら、立地条件の改善に加えて、更新植物の分布様式にもケヤマハンノキの分布様式が影響するかもしれない。

植物は固着性のため、遠くの散布源から種子の定着を促進する種子散布の機構は、一次遷移において最も重要である (Finegan 1984; Walker and Chapin 1987)。更新個体の初期の空間分布 (Houle 1992) と個体群の空間構造 (Armest et al. 1991) は、母樹の位置と種子散布能力により決まる (Nanami et al. 1999)。攪乱を受けた立地では、林分発達の初期段階に侵入する樹種以外の他の樹種の母樹は存在しないことが予想される。鳥散布型の種子を持つ植物では、上層に同種の成熟個体が少ない場所で、他樹種の上層木が鳥の止まり木として利用され、鳥散布型の植物の種子供給・更新の源としての役目を果たしている場合が報告されている (Hatton 1989; Maltez-Mouro et al. 2007)。温帯地域では、多くの果樹が渡り鳥による種子散布に依存している (Johnson et al. 1985; Nakanihisi 1996)。過去に攪乱を受けた立地に天然更新したケヤマハンノキは鳥のための止まり木として利用され、さらに、鳥散布種子にとっての母樹としての役割を演じるかもしれない。もしケヤマハンノキが母樹としての役割を持つならば、他の鳥散布型の種子を持つ樹種の研究例 (Maltez-Mouro et al. 2007) でも見られるように、ケヤマハンノキの周囲に鳥散布の種子を持つ樹種が更新していることが予想される。種子の

発芽・生残、実生の生残、稚樹の成長、草本との競争、光環境、土壤水分環境、リターによる物理的障害など、多くの過程が各更新樹種の現在の分布に影響する。

2. 3節では、更新樹種の空間分布に影響する多くの要因の中の一つとしてケヤマハンノキの存在を考え、ケヤマハンノキによる土壤発達後の樹種更新に及ぼすケヤマハンノキの分布の影響を明らかにすることを目的とした。ケヤマハンノキ林分内に更新した主な樹種についてケヤマハンノキとの分布相関を解析した。解析する際に、更新樹種の種子散布型の違いを考慮した。

2. 3. 2 材料と方法

2. 3. 2. 1 調査地

前節までと同じ調査地のケヤマハンノキ林分の林床は草本植物に覆われていたが、数種の高木種と低木種も更新していた。窒素固定能をもつ樹種は、ケヤマハンノキを含めて更新していなかった。隣接する林分は薪炭林として利用されていたと考えられ、現在は、クロマツ、ミズナラ、シラカンバ、ウワミズザクラ、ダンコウバイ、フサザクラが優占していた。

2. 3. 2. 2 更新樹種

調査地の林床に更新した木本樹種の空間分布様式を調べるために、調査地内に天然更新した木本樹種の毎木調査を行った (1996 年)。出現した全個体の樹高と幹の位置を測定した。調査地内に 25 個体以上出現した樹種を主な更新樹種とみなし空間分布様式を解析した。

2. 3. 2. 3 更新樹種の空間分布解析

調査地内の 1995 年以前に枯死したケヤマハンノキ個体 (枯死立木、枯死倒木、枯死株) の位置を確認し、枯死個体を含めたケヤマハンノキ個体群の分布を確認できる範囲で再構築した。調査地において 5 種類のケヤマハンノキ個体群データを解析に用いた: 1995 年までの枯死個体を含む全個体、1995 年 4 月の生残個体、1996 年 4 月の生残個体、1997 年の生残個体、1996 年 4 月までに枯死した個体。更新樹種との空間分布相関の解析には、次の 3 つの個体群データを使用した: 1996 年 4 月の生残個体、1995 年までの枯死個体を含む全個体、1996 年 4 月までに枯死した個体。1995 年までに枯死した個体は、痕跡のあるもののみを対象としたため、過小評価になることを認識している。ケヤマハンノキと更新樹種、それぞれの水平分布様式を Ripley's $K(t)$ 関数 (Ripley 1977) を改変した $L(t)$

関数を用いて解析した。詳細は、2. 1. 2. 2に記載した。

二つの個体群間の空間分布相関は二変数関数 (bivariate function) $L_{12}(t)$ 、を用いて解析した。この式は、Lotwick and Silverman (1982) の関数 $K_{12}(t)$ を変換したものである：

$$L_{12}(t) = [K_{12}(t) / \pi t^2] - t \quad (1)$$

関数 $K_{12}(t)$ は、関数 $K(t)$ を一般化したものである。 $L_{12}(t) = 0$ の場合、二つの集団が空間的に独立な関係であることを意味する。 $L_{12}(t) > 0$ の場合は、同所的関係 (positive association (attraction)) を意味し、 $L_{12}(t) < 0$ の場合は、排他的な関係 (negative association (repulsion)) を意味する。これらの関数の統計的有意性はモンテカルロシミュレーションにより示される (Besag 1977; Nanami et al 1999)。帰無仮説は、関数 $L(t)$ では調査地内で完全に空間的にランダム分布をしているというもので、関数 $L_{12}(t)$ では二つの集団の空間的相互関係が独立であるというものである。実際に観察されたデータセットと同じ数の点をランダムに分布させる作業を調査地内で 1000 回試行する。毎回のランダムデータセットに対して、 $t = 0.5 \text{ m}$ から $t = 10.0 \text{ m}$ まで 0.5 m 間隔で $L(t)$ を計算する。 $L(t)$ 値の頻度分布を用いて、95% と 99% 信頼区間を決めた。両方の関数の使用とモンテカルロシミュレーションについては、これまでも議論されている (Peterson and Squiers 1995; Nanami et al 1999)。

2. 3. 3 結果

2. 3. 3. 1 ケヤマハンノキの空間分布

ケヤマハンノキ個体群は、4 種類のデータで有意な集中分布を示した (図 1)；1995 年までの枯死個体と生残個体 (全個体) が 0.5 m ($P < 0.01$)、1995 年 4 月の生残個体が $0.5 - 1.0$ 、 $5.5 - 6.0 \text{ m}$ 、 8.0 m ($P < 0.05$) と $8.5 - 10.0 \text{ m}$ ($P < 0.01$)、1996 年 4 月の生残個体が $9.5 - 10.0 \text{ m}$ ($P < 0.05$) と 0.5 m ($P < 0.05$)、1997 年の生残個体が $0.5 - 1.0 \text{ m}$ ($P < 0.05$)。

2. 3. 3. 2 更新樹種の樹種構成

この林分では、全体で 23 種 389 個体が更新しており (表 1)、更新木全体の密度は 0.37 本 m^{-2} であった。高木種は 14 樹種 229 個体で、低木種は 9 種 160 個体であった。種子散布型では、鳥散布型 (endozoochory plants) が 13 種 239 個体、風散布型 (anemochory plants) が 7 種 106 個体、重力散布

型 (bolochory plants) が 3 種 44 個体であった。高木では、マメザクラ (*Prunus incisa*) が最も多く、続いて、ミズキ (*Cornus cnotroversa*)、オニグルミ (*Juglance mandshurica*)、ウリハダカエデ (*Acer rufinerve*) が多く更新していた。低木では、タニウツギ (*Weigela hortensis*) が最も多く、続いて、ニワトコ (*Sambucus racemosa*)、タラノキ (*Aralia elata*) が多く更新していた。林床にケヤマハンノキの実生はなかった。

全更新樹種を合わせた樹高の頻度分布は 0 - 0.5 m にモードを示した。バッコヤナギ (8 m 程度) を除いて、全ての高木種の個体が樹高 4 m 以下であった (表 1)。低木種の樹高は 3 m 以下であったが、樹高の高い個体の割合は高木種より多かった。

2. 3. 3. 3 更新樹種の分布様式

更新樹種全体の分布は、全てのスケールにおいて有意に集中分布を示した。顕著なピークは示さなかったが、1.5 m で最大の集中度を示した ($P < 0.01$; 図 2A)。重力散布型 3 種を合わせた個体群は、1.5 から 2 m のスケールで有意に集中分布を示した ($P < 0.05$; 図 2B)。鳥散布型 13 種を合わせた個体群も、0.5 から 10.0 m のスケールで有意に集中分布を示した ($P < 0.01$; 図 2C)。風散布型 7 種を合わせた個体群は、0.5 から 5.5 m ($P < 0.01$) と 6 m ($P < 0.05$) で有意に集中分布を示し、0.5 m で最大の集中度を示した (図 2D)。

25 個体以上出現した樹種は 7 種で、重力散布型のオニグルミ、風散布型のウリハダカエデ、タニウツギ、鳥散布型のミズキ、マメザクラ、ニワトコ、タラノキであった。ウリハダカエデ、ニワトコ、タラノキは全てのスケールで有意に集中分布を示した ($P < 0.05$ もしくは 0.01 ; 図 3B, F, G)。低木の 1 種のタニウツギも、10 m のスケール以外の全てのスケールで有意な集中分布を示した ($P < 0.05$ もしくは 0.01 ; 図 3C)。低木種は高木種に比べて、より広いスケールで有意な集中分布を示した。鳥散布型の 2 種、ミズキとマメザクラは低木種の鳥散布型のニワトコやタラノキとは異なる分布を示した。ミズキは 0.5 から 2 m ($P < 0.01$)、2.5 m ($P < 0.05$) で有意な集中分布を示した (図 3D)。マメザクラは、0.5 から 3.5 m ($P < 0.01$) で有意な集中分布を示した (図 3E)。オニグルミは、0.5、1.5、と 7.5 m 以外では、ランダム分布との有意な違いを示さなかった (図 3A)。タラノキは 3 m ではっきりしたピークを示した (図 3G)。

2. 3. 3. 4. 更新樹種とケヤマハンノキの空間的相互作用

更新樹種全個体の個体群は 0.5 から 2 m ($P < 0.01$) と 2.5 m ($P < 0.05$) のスケールでケヤマハンノキ

(1996年4月生残個体)と同所的分布を示した(図4A)。種子散布型別で解析した結果、重力散布型3種を合わせた個体群と風散布型7種を合わせた個体群は、ケヤマハンノキ個体群と独立した分布から有意に違いを示さなかった(図4B, D)。鳥散布型亜13種を合わせた個体群は、0.5から1.5 m ($P < 0.01$)と2 m ($P < 0.05$)のスケールでケヤマハンノキと有意な同所的分布を示した(図4C)。これらの更新樹種の空間分布相関の結果は、1995年の枯死個体を含めた全個体のケヤマハンノキ個体群と解析した場合でもほとんど同じ傾向を示した。

樹種ごとのケヤマハンノキとの分布相関は、オニグルミ、ウリハダカエデ、タラノキはケヤマハンノキ個体群(1996年4月生残個体)と独立分布との有意な違いを示さなかった(図5A, B, G)。タニウツギはケヤマハンノキ個体群と4.5 m ($P < 0.05$)のスケールで有意に排他的な分布を示した(図5C)。マメザクラは、ケヤマハンノキ個体群と0.5から2.5 m ($P < 0.01$)のスケールで有意に同所的な分布相関を示した(図5E)。ニワトコは2から2.5 m、5.5から7.5 m ($P < 0.05$)のスケールで有意に同所的な分布を示した(図5F)。ミズキはケヤマハンノキ個体群と独立分布との有意な違いを示さなかった(図5D)。しかし、1995年の枯死個体を含めた全個体のケヤマハンノキ個体群と解析した場合には、0.5から1.5 m ($P < 0.01$)と2から2.5 m ($P < 0.05$)のスケールで有意に同所的な分布を示した(データは示していない)。

タラノキ、ウリハダカエデ、タニウツギのケヤマハンノキ枯死個体(1996年までに枯死した個体)との分布相関は以下ようになった。タラノキは0.5 m ($P < 0.05$)と1.5 m、3.5から6.0 m ($P < 0.01$)で、ケヤマハンノキ枯死個体と有意に同所的な分布相関を示した(図6C)。タニウツギも2から2.5 m ($P < 0.05$)で、有意に1996年4月までに枯死したケヤマハンノキ個体群と同所的な分布を示した(図6B)。一方、ウリハダカエデは4.5 m ($P < 0.05$)で1996年4月までに枯死したケヤマハンノキ個体群と排他的な分布を示した(図6A)。

2. 3. 4 考察

林床の更新樹種はケヤマハンノキの近くに分布する傾向を示した。特に、比較的耐陰性の高い、鳥散布型の種子を持つ樹種がケヤマハンノキと同所的な分布を示した。これらの結果から、ケヤマハンノキが止まり木として利用され、これらの鳥散布型の種子を持つ樹種にとって母樹としての役割を演じたことが示唆された。この林分で更新した26種中13種を占める鳥散布型の種子を持つ樹種は、土壌の攪乱後にケヤマハンノキの林分が形成された立地で、他の種子散布型を持つ樹種より

も早く更新する可能性があることが示唆された。

全更新樹種で解析した場合、更新樹木の分布様式がヤマハンノキの 1996 年生残個体の分布と相関関係（同所的分布）を示した（図 2A）が、樹種別では分布相関が異なった。ケヤマハンノキと同所的分布を示す樹種があった（マメザクラとニワトコ）。鳥散布樹種の中にもミズキとタラノキのように、現在のケヤマハンノキの分布とは独立して分布している樹種もあった。その他に独立分布を示した樹種は、オニグルミ（重力散布型）とウリハダカエデ（風散布型）だった。タニウツギ（風散布型）はケヤマハンノキと排他的な分布を示し（図 5C）、Thomas and Borman (1998) の風散布型の種が排他的な分布を示すという結果と一致した。

予想したとおり、鳥散布樹種の中には、マメザクラとニワトコのように、ケヤマハンノキと同所的な分布の傾向を示す樹種が確認された（図 5E, F）。鳥散布型の種子を持つ *Viburnum tinus* でも同様の報告があり、上層に同種の成熟個体が少ない場所で、*Viburnum tinus* の更新個体が集中分布を示した (Maltez-Mouro et al. 2007)。この原因の一つとして、他樹種の上層木が鳥の止まり木として利用され、その下に種子が散布されたと考察している。鳥散布型の種子を持つ草本種の例でも、大きなサイズの樹木の下で強い集中分布を示し、大きなサイズの樹木が鳥の止まり木となり、鳥散布型の植物の種子供給・更新の源としての役目を果たしていたことが報告されている (Hatton 1989)。ハンノキ属樹種の人工林ではユーカリやマツの人工林に比べて鳥類の多様性が高く、その原因は土壌の肥沃化に伴い鳥の餌となる土壌動物が多く存在するためと考えられている (Carlson and Dawson 1985)。本研究では、鳥類の調査や種子散布量の調査を行っていないが、ケヤマハンノキ林分でも日中に多くの鳥が集まることが観察されており、ケヤマハンノキが止まり木として鳥散布種子の種子供給源の役目を演じている可能性が推察された。

ただし、鳥散布型の樹種でもミズキとタラノキのようにケヤマハンノキ（1996 年生残個体）と独立した分布様式を示す場合があった（図 5D, G）。ミズキでは、ケヤマハンノキの枯死個体まで含めて解析を行った場合には同所的な分布を示した（データを示していない）。ケヤマハンノキの枯死に伴い、分布の同所性が不明瞭になったことが示唆された。一方、タラノキは光要求度が高い樹種である (Tobita et al. 1993)。タラノキはケヤマハンノキの枯死個体との間で同所的な分布相関を示した（図 6C）ことから、種子散布に加えて、ケヤマハンノキの枯死による光環境の改善が必要であることが推察された。

風散布型の種子を持つタニウツギも、タラノキと同様ケヤマハンノキの枯死個体との間で同所的な分布相関を示し（図 6B）、しかも、ケヤマハンノキの生残個体に対して排他的な分布を示した（図

5C)。風散布型の種子を持つ種が、マメ科の *Trifolium* に対して排他的な分布を示したこと (Thomas and Borman 1998) と同じ傾向が見られた。一方、同じ風散布型の種子を持つウリハダカエデは、逆にケヤマハンノキの枯死個体との間で排他的な分布相関を示し (図 6A)、ケヤマハンノキの生残個体に対して独立した分布を示した (図 5B)。ウリハダカエデは耐陰性の低い下層種である (Masaki et al. 1992) が、本調査地の結果からは、タニウツギのほうがウリハダカエデよりも光の要求度が高い可能性が示唆された (Katsuta et al. 1998)。ただし、タニウツギは株立ちの個体が多く見られたことから、分布の解析結果に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

重力散布は母樹の位置や、二次散布として動物の行動にも依存する。例えば、クロマツ林分の林床で更新したコナラの稚樹の分布は母樹の位置のみでは説明することができなかった (Tobita et al. 1993)。本調査地で出現した重力散布型の種子を持つオニグルミは、ケヤマハンノキとは独立した分布を示したが (図 5A)、ケヤマハンノキの幹のごく近くに分布する傾向が観察されており、動物による散布の影響が推察された。

現在の更新樹種の分布にはさまざまな要因が影響している (Maltez-Mouro et al. 2007)。分布様式は、食害や病原菌による死亡、ギャップ攪乱、生活史、競争、養分量などの生育場所の不均一性、母樹からの種散布範囲、など広範囲のプロセスの観点から解釈される (Hatton 1989)。本研究では、環境要因を考慮していないため、更新樹種の分布に影響を及ぼす要因に関して詳細な解析を行うことはできないが、数多くある要因の中の一つの要因として、ケヤマハンノキの存在が樹木の更新を促進している可能性が示唆された。窒素固定樹種でなくても、上層木の存在が林床の物理的環境の変化を促進させる (Maltez-Mouro et al. 2007)。今回、ケヤマハンノキは窒素固定能力による土壌の肥沃化と、立地環境の改善による更新の促進に加えて、止まり木としての鳥散布種子の種子供給源としての更新の促進にも貢献していることが示唆された。

表1 ケヤマハンノキ林分の林床に天然更新した樹種の個体数と樹高頻度。樹種は、生活型（高木と低木）に分けて並べた。種子散布型は、重力散布型 (bolochory; B); 鳥散布型 (endozoochory; E); 風邪散布型 (anemochory; A) に分けて示した。確定的でないものに関しては、括弧書きで示した（例えば、(B)）

Species	Seed dispersal type	Number/plot	Hight (m)				
			0 - 0.5	0.5 -1.0	1.0 -1.5	1.5 -2.0	>2.0
Tree species							
<i>Prunus incisa</i>	E	64	9	12	4	3	1
<i>Cornus controversa</i>	E	54	4	6	9	8	7
<i>Juglans mandshurica</i>	(B)	34	18	6	2	2	5
<i>Acer rufinerve</i>	(A)	28	14	4		1	1
<i>Acer mono</i>	(A)	13	4	5	3		
<i>Castanea crenata</i>	(B)	9	5	1			
<i>Malus toringo</i>	(E)	8	8				
<i>Pourthiaea villosa</i>	E	4	2		2		
<i>Prunus grayana</i>	E	4	2			1	1
<i>Prunus sargentii</i>	(E)	4	1	1	1	1	
<i>Salix bakko</i>	(A)	4				1	3
<i>Acer crataegifolium</i>	A	1				1	
<i>Quercus mongolica</i>	(B)	1	1				
<i>Rhus trichocarpa</i>	(E)	1			1		
Shurub species							
<i>Weigela hortensis</i>	(A)	49	1	7	18	16	7
<i>Sambucus sieboldiana</i>	E	45	12	10	12	8	2
<i>Aralia elata</i>	(E)	26	3	2	5	6	3
<i>Eunymus sieboldianus</i>	E	16	1	1	2		
<i>Hydrangea paniculata</i>	(A)	10		3	2	3	2
<i>Viburnum opulus</i>	(E)	7	6	1			
<i>Stachyurus praecox</i>	(E)	5	1	1	3	3	1
<i>Abelia serrata</i>	(A)	1			1		
<i>Lindera obtusiloba</i>	E	1					1
Total		389	73	58	62	52	33

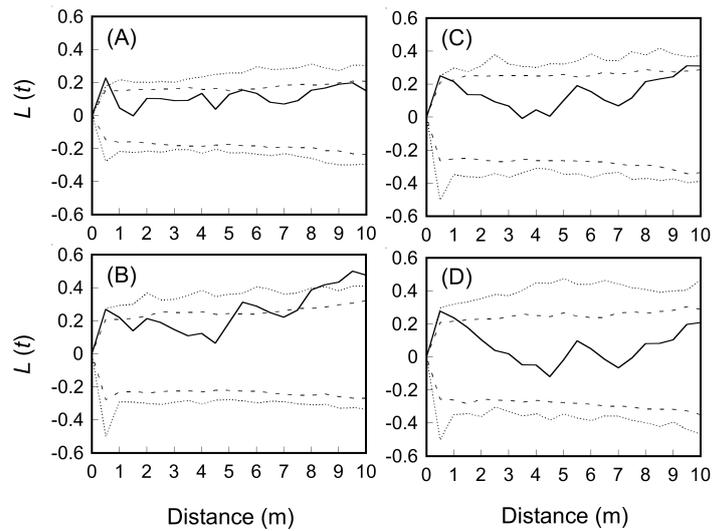


図1. ケヤマハンノキの分布様式 ($L(t)$ 値)。 (A) 1995年までの枯死個体を含む全個体、 (B) 1995年4月の生残個体、 (C) 1996年4月の生残個体、 (D) 1997年の生残個体。実線が実際に観察された個体 $L(t)$ 値を示す。点線と破線は、それぞれ、モンテカルロシミュレーションにより、調査地内で個体数と同じ数の点をランダムに分布させる作業を1000回の試行した結果から得られた、95%と99%信頼区間を示す。区間の外側は、ランダム分布から有意に離れていることを意味する

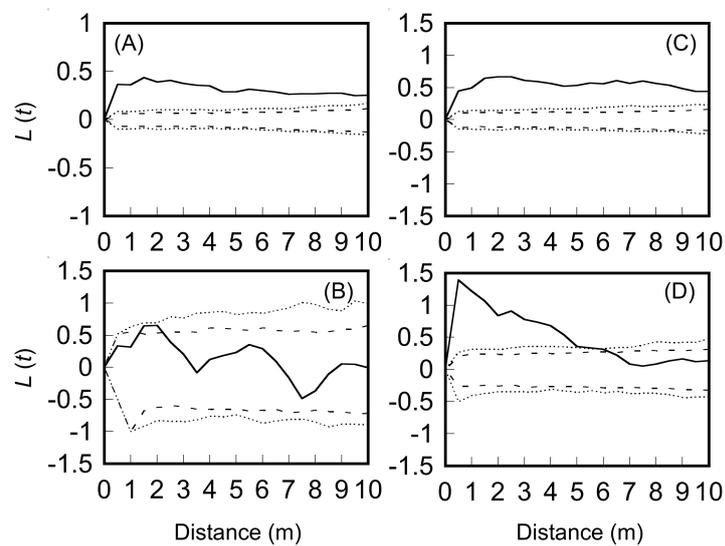


図2. ケヤマハンノキ林分の林床に更新した樹種の分布様式 ($L(t)$ 値)。 (A) 全種 (23種, $n = 389$); (B) 3種の重力散布型 (bolochory) ($n = 44$); (C) 13種の鳥散布型 (endozoochory) ($n = 239$); (D) 7種の風邪散布型 (anemochory) ($n = 106$)。表示は図1と同じ

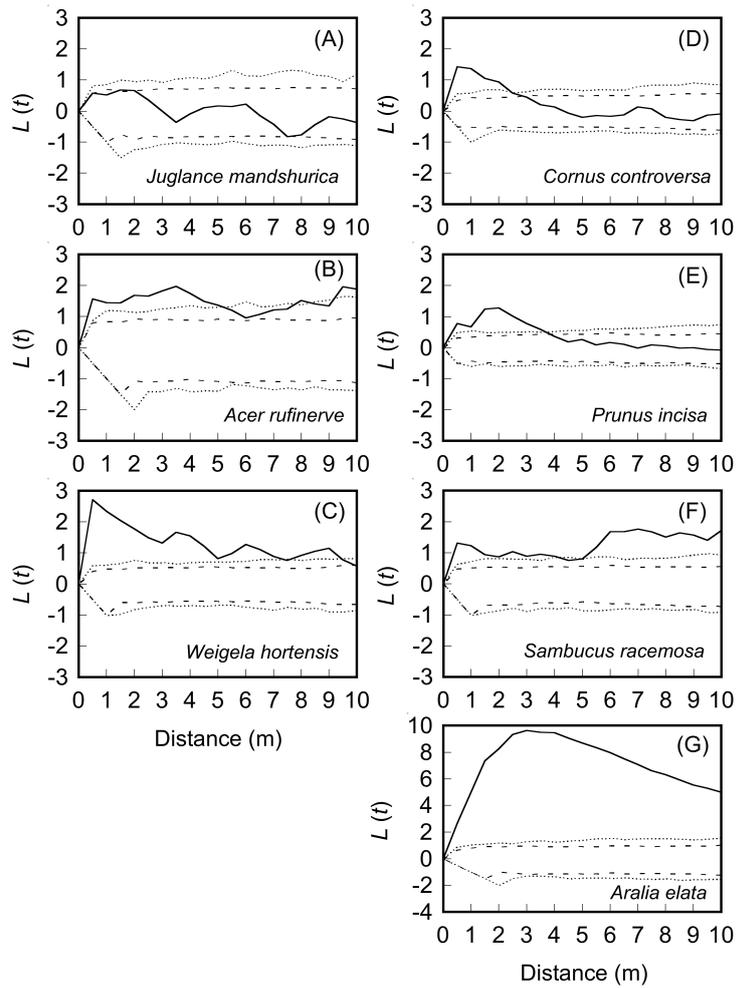


図3. ケヤマハンノキ林分の林床に更新した樹種の中で個体数が20以上出現した樹種の分布様式 ($L(t)$ 値)。 (A) オニグルミ (*Juglance mandshurica*)、(B) ウリハダカエデ (*Acer rufinerve*)、(C) タニウツギ (*Weigela hortensis*)、(D) ミズキ (*Cornus controversa*)、(E) マメザクラ (*Prunus incisa*)、(F) ニワトコ (*Sambucus racemosa*)、(G) タラノキ (*Aralia elata*)。表示は図1と同じ

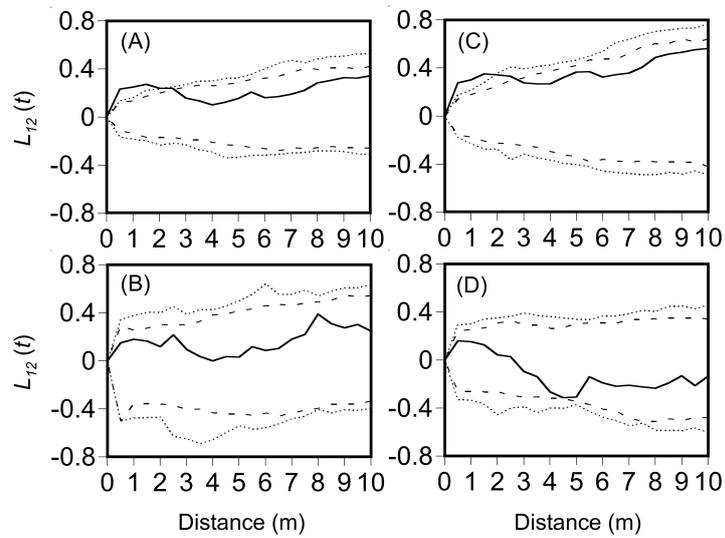


図 4. ケヤマハンノキ林分の林床に更新した樹種のケヤマハンノキ（1996 年 4 月の生残個体）との分布相関 ($L_{12}(t)$ 値)。 (A) 全種 (23 種, $n = 389$)、 (B) 3 種の重力散布型 (bolochory) ($n = 44$)、 (C) 13 種の鳥散布型 (endozoochory) ($n = 239$)、 (D) 7 種の風邪散布型 (anemochory) ($n = 106$)。実線が実際に観察された個体 $L_{12}(t)$ 値を示す。点線と破線は、それぞれ、モンテカルロシミュレーションにより、調査地内で個体数と同じ数の点をランダムに分布させる作業を 1000 回の試行した結果から得られた、95% と 99% 信頼区間を示す。区間の外側は、独立分布から有意に離れていることを意味する

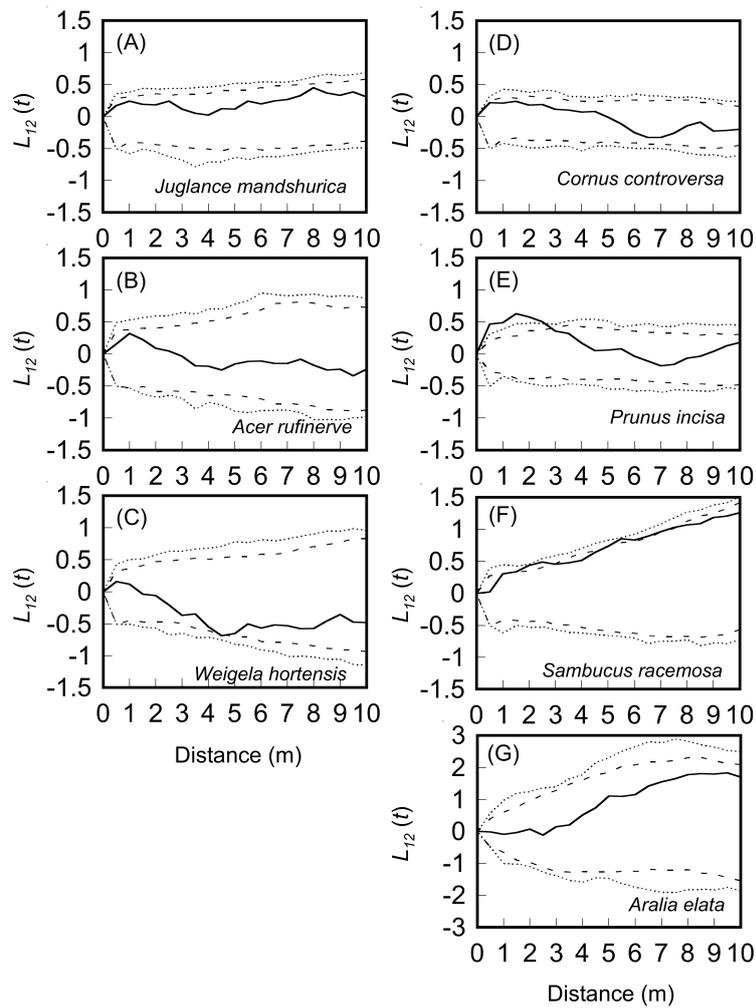


図 5. ケヤマハンノキ林分の林床に更新した樹種の中で個体数が 20 以上出現した樹種のケヤマハンノキ (1996 年 4 月の生残個体) との分布相関 ($L_{12}(t)$ 値)。 (A) オニグルミ (*Juglance mandshurica*)、 (B) ウリハダカエデ (*Acer rufinerve*)、 (C) タニウツギ (*Weigela hortensis*)、 (D) ミズキ (*Cornus cnotroversa*)、 (E) マメザクラ (*Prunus incisa*)、 (F) ニワトコ (*Sambucus racemosa*)、 (G) タラノキ (*Aralia elata*)。 表示は図 4 と同じ

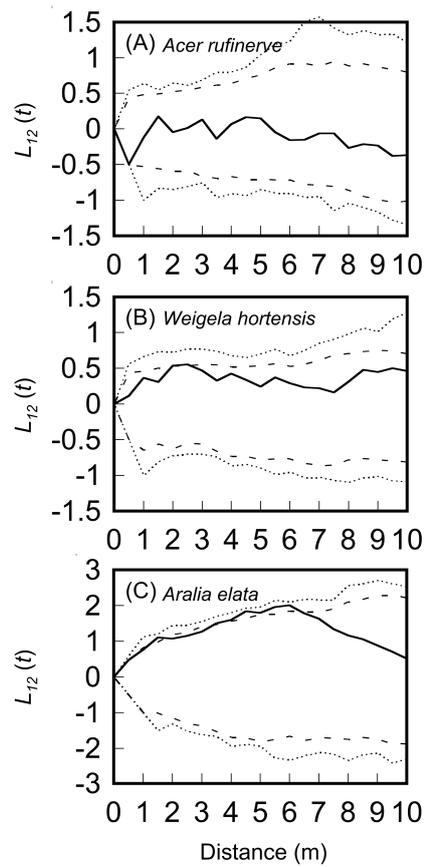


図 6. ケヤマハンノキ林分の林床に更新した 3 樹種のケヤマハンノキ (1996 年 4 月以前に枯死した個体) との分布相関 ($L_{12}(t)$ 値)。 (A) ウリハダカエデ (*Acer rufinerve*)、 (B) タニウツギ (*Weigela hortensis*)、 (C) タラノキ (*Aralia elata*)。 表示は図 4 と同じ

第3章

ケヤマハンノキの根粒形成、光合成特性、成長に及ぼす高 CO₂ と窒素供給量の影響

第3章と第4章では、土壤養分・水分条件が高 CO₂ に対するケヤマハンノキの根粒形成や光合成特性、成長における反応に及ぼす影響を明らかにするために、自然光型のファイトトロンにおいてポット苗を用いた二つの実験を行った。まず、第3章では、一つ目の実験、CO₂ 濃度と土壤窒素供給量がケヤマハンノキの成長と根粒形成に及ぼす影響について結果を示す。

3. 1 成長と根粒形成に及ぼす高 CO₂ と窒素供給量の影響

3. 1. 1 背景

近年大気中の CO₂ 濃度が上昇し続けており、CO₂ 濃度の上昇は地球規模の気候変動に影響を及ぼす重要な要因の一つと考えられている (Houghton et al. 2001; IPCC 2007)。100 年後には現在の2倍の濃度まで CO₂ 濃度が上昇する可能性があることや、北半球の高緯度地域ほど環境変動の影響が大きいことなどが予想されている。土壤中の窒素供給量不足により、高い CO₂ 濃度 (高 CO₂) 条件下での光合成能力の低下 (光合成のダウンレギュレーション) が生じる場合がある (Rogers et al. 1998; Adam 2000; Ainsworth and Rogers 2007)。森林生態系では窒素が充分ある場合が少ない (Vitousek and Howarth 1991)。高 CO₂ 下で樹木の成長量が増加した場合、その成長量を維持するための養分要求量が増大する。その結果として、高 CO₂ 下では窒素が徐々に不足し、高 CO₂ 下での樹木の成長量の増加が抑制されると予想されている (Luo et al. 2004)。現時点では、高 CO₂ 下で樹木の成長促進を維持するためには、森林生態系外からの窒素の追加供給が必要と考えられている (Johnson 2006; Reich et al. 2006)。ケヤマハンノキのような共生的生物窒素固定能力を持つ樹木は、土壤窒素に対する依存度が低いため、窒素固定能力を持たない植物に比べて高 CO₂ に対してより直接的に反応することが予想され、将来の高 CO₂ 環境での窒素供給という観点から注目されている (Houghton et al. 2001)。高 CO₂ 下で窒素固定量が増加し、リターによる窒素供給量を通じて土壤の窒素供給量を増加させることに

より、窒素固定能を持たない他の植物の高 CO_2 に対する成長反応が改善されることが期待されている (Norby 1987; Hartwig et al. 1996)。

フランキアと共生し窒素固定を行うケヤマハンノキの根粒の形成と、根粒による窒素固定のためには光合成生産物の供給が必要である。土壌中に無機態窒素が多く存在する場合、根粒形成や根粒の窒素固定活性が抑制される (Ekblad and Huss-Danell 1995; Koike et al. 1997; Vogel et al. 1997; Zanetti et al. 1998)。これは、ハンノキ属樹種の窒素固定に必要なエネルギー（光合成生産物の供給）が、土壌中の無機態窒素を吸収する際に必要なエネルギーよりも大きいため (Chapin et al. 2002) であり、宿主であるケヤマハンノキによる制御機構が作用するためである (Wall and Berry 2008)。高 CO_2 環境下では光合成の基質となる CO_2 濃度が高いため、ハンノキ属樹種の光合成速度が高まり、根粒への光合成生産物の配分の増加、根粒形成の促進や、根粒のニトロゲナーゼ活性（窒素固定活性）の上昇が予想される (Norby 1987; Arnone and Gordon 1990; Vogel et al. 1997; Schortemeyer et al. 1999; Thomas et al. 2000; Watanabe et al. 2008)。そのため、土壌の窒素供給量の増加に伴う根粒形成の抑制や根粒のニトロゲナーゼ活性の低下が高 CO_2 下で緩和される可能性も考えられる (Thomas et al. 2000)。もしそうであれば、窒素固定樹種が吸収した窒素に占める窒素固定由来の窒素の占める割合が高まり、窒素固定の寄与できる期間も長くなり、窒素固定による系外からの窒素の収入が高 CO_2 下で増加する可能性がある。3. 1 節では、ケヤマハンノキの、1. 樹木個体の成長と樹木個体あたりの根粒重量、2. 根粒の活性と樹木個体あたりの窒素固定量、に及ぼす高 CO_2 と窒素供給量の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 1. 2 材料と方法

3. 1. 2. 1 対象樹種

ケヤマハンノキ1年生（王子木材緑化、栗山産）を、5 リットル（直径 21 cm）のプラスチック製ポットに移植した。土壌には、鹿沼土と赤玉土を体積で 1 対 1 の割合で混合した土を用いた。各ポットは養分が抜けないようにトレーに乗せた。実験開始時の苗の高さは 14 cm から 18 cm であった。移植時に苗の根系に根粒の形成を確認した。

3. 1. 2. 2 実験設定

北海道札幌市の森林総合研究所北海道支所 (43°N, 141°E; 180 m a.s.l.) において、 CO_2 濃度制御装置

(DAIWA Air Co. Ltd., Sapporo, Japan) を備えた自然光型のファイトトロン内 (Koito Industries, Yokohama, Japan) でポット植栽苗木を生育させた。CO₂ 濃度を 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (通常 CO₂, コントロールまたは 36 Pa) と 100 年後に現実となる可能性がある 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (高 CO₂ または 72 Pa) に設定し、5 月中旬に処理を開始した。CO₂ 濃度処理ごとに 2 つのチャンバーを用いた。CO₂ 処理の詳細はこれまでも報告されている (Kitao et al. 2007; Watanabe et al. 2008)。各樹種 18 個体をそれぞれのチャンバーで育てた。その中の 6 個体ずつを、窒素供給量を 52.5 mg N pot⁻¹ 週⁻¹ (High-N) と、その 10 分の 1 の 5.25 mg N pot⁻¹ 週⁻¹ (Low-N)、さらに窒素を全く与えない N-free 区に設定した。肥料は 1/2 Hoagland 液を元に、少し改変を加えて調合した (Asher and Edwards 1983)。養分液の組成は次の通りである。3 mM HNO₃、2 mM Ca(NO₃)₂/4 H₂O、0.5 mM NH₄H₂PO₄、1 mM MgSO₄/7 H₂O、25 μM EDTA-Fe、4.5 μM MnCl₂/4 H₂O、23 μM H₃BO₃、0.4 μM ZnSO₄/7 H₂O、0.15 μM CuSO₄/5 H₂O、0.007 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄/4 H₂O。Low-N と N-free の処理では、KCl、CaCl₂、KH₂PO₄ を用いて、K⁺ と Ca²⁺ が High-N と等量となるように与えた。4 回に 1 回は塩類集積を避けるために水のみ与えた。他の養分は等量与えた。気温は、26 / 16°C (日中/夜間) で変化させた。ポットはトレーの上に置き、乾燥しないように適宜水を与えた。

3. 1. 2. 3 各器官のバイオマスと窒素含量

処理開始から 100 日後に各処理 6 個体ずつを刈り取り、葉面積、各器官の乾燥重量を測定した。サンプル個体の各器官の窒素含量を NC アナライザー (SUMIGRAPH, NC-800) を用いて分析した。

3. 1. 2. 4 根粒のニトロゲナーゼ活性と推定窒素固定量

N-free 区では、窒素源が窒素固定由来の窒素のみであるため、サンプル個体の刈り取り時の総窒素含量から実験開始時の個体の総窒素含量 (初期値) を引いた値 (Total plant nitrogen increment; TPN) を、100 日間の個体あたりの窒素固定量と考えた。サンプル個体の初期値は、実験開始時に 25 個体をサンプリングして求めた相対成長式と樹木個体の窒素濃度から推定した。根粒 1 g のニトロゲナーゼ活性 (Specific nitrogenase activity; SNA) は、樹木個体の総窒素含量の増加分 (TPN) を根粒重量の平均値 (Nodule weight; NW) と処理日数で割って算出した (Tissue et al. 1997)。

$$\text{SNA} = \text{TPN} * \text{NW}^{-1} * [\text{day}]^{-1} \quad (1)$$

根粒重量の平均値は実験開始時と 100 日後の根粒重量の平均値を用いた。根粒重量は実験期間中、直線的に増加すると仮定した。

3. 1. 2. 5 統計解析

スプリットプロットデザインの 2-way ANOVA でバイオマス（樹木個体重量や根粒重量）、葉面積、窒素含量に及ぼす CO₂ と窒素供給量の影響を解析した (JMP; SAS Institute 2003; $P < 0.05$)。 $P < 0.10$ を傾向があると解釈した。共分散分析で根粒重量など各器官のバイオマスや葉面積に対する各処理の効果を解析した。樹木個体重量を共変量とし、各処理 (CO₂ × N の 4 処理区) を説明変数として用いた。Student's *t*-test で N-free 区の個体の SNA に及ぼす CO₂ と窒素供給量の影響を解析した。

3. 1. 3 結果

3. 1. 3. 1 樹木個体と根粒のバイオマス

高 CO₂ は、窒素処理に関わらず樹木個体あたりの重量、葉重量、葉面積に有意な正の効果を及ぼした (表 1)。ケヤマハンノキ 1 個体あたりの根粒重量は、高 CO₂ で増加する傾向を示し、窒素供給量が少ないほど増加した (図 1 A)。ケヤマハンノキの樹木個体重量は窒素供給量によらず高 CO₂ で増加した (図 1 B)。

3. 1. 3. 2 バイオマス配分

樹木個体あたりの根粒重量は樹木個体重量の増加に伴い増加したが、両者の関係は CO₂ 処理間では差がなかった (ANCOVA, $P > 0.1$; 図 2)。樹木個体あたりの根粒重量と樹木個体重量との関係は、窒素処理間で差があり、High-N では、Low-N と N-free に比べて樹木個体重量に対する根粒重量の比率が低下した (図 2)。

3. 1. 3. 3 樹木個体の窒素含量

ケヤマハンノキ 1 個体あたりの総窒素含量は、土壌の窒素供給量に拘わらず高 CO₂ で多くなる傾向を示した ($P < 0.001$; 表 2)。

3. 1. 3. 4 根粒のニトロゲナーゼ活性と推定窒素固定量

窒素源が窒素固定のみに限定される N-free 区で計算した結果、統計的な有意差はないが高 CO₂ で個体あたりの窒素固定量が増加する傾向を示した (通常 CO₂; 800 (± 77) mgN plant⁻¹, 高 CO₂; 903 (± 37) mgN plant⁻¹)。一方、根粒 1 g あたりのニトロゲナーゼ活性は高 CO₂ 下で低下する傾向を示した (通常 CO₂; 2.5 (± 0.14) mmolN g nodule⁻¹ day⁻¹, 高 CO₂; 2.2 (± 0.11) mmolN g nodule⁻¹ day⁻¹; *t*-test, *P* = 0.06)。

3. 1. 4. 考察

3. 1. 4. 1 根粒形成

ケヤマハンノキの樹木個体あたりの根粒重量は、通常大気に比べて高 CO₂ で生育させた場合に増加した (図 1) が、この高 CO₂ 下における根粒重量の増加は、樹木個体の重量が増加した結果であることが明らかになった (図 2)。同様の結果は *Alnus rubra* でも報告されている (Hibbs et al. 1995)。同じハンノキ属樹種で、相対成長関係の変化により樹木個体重量に占める根粒の比率が増加した報告もある (Tjepkema et al. 1986) が、今回の実験では高 CO₂ 下で樹木個体重量と根粒重量の間の相対成長関係は変化せず、成長促進による樹木個体重量の増加に伴い根粒重量が増加したことが明らかになった。

3. 1. 4. 2 窒素供給量による根粒形成の抑制

CO₂ 処理に関わらず、High-N で他の 2 処理 (Low-N と N-free) に比べて根粒重量 (図 1) と樹木個体重量に対する根粒重量の比率 (図 2) が低下したことから、高 CO₂ 下でも通常大気の場合と同様に、土壌の窒素供給量が多い時に根粒形成が抑制されることが明らかになった。他のハンノキ属数樹種でも高 CO₂ 下で窒素供給量の増加による根粒形成の抑制効果が報告されている (Norby 1987; Koike et al. 1997; Temperton et al. 2003)。リゾビウム (*Rhizobium*) と共生関係を持つマメ科植物 *Gliricidia sepium* では、高 CO₂ 下で窒素供給量の増加による根粒形成の抑制が緩和される例も報告されている (Thomas et al. 2000) が、今回のケヤマハンノキではそのような傾向は見られなかった。

3. 1. 4. 3 窒素固定量

窒素供給をしていない N-free 区において高 CO₂ 下で窒素吸収量が増加した (表 2) ことは、高 CO₂ 下で窒素固定量が増加したことを意味する。一方、根粒 1 g あたりのニトロゲナーゼ活性 (SNA) は

高 CO₂ 下で低下傾向を示した。ハンノキ属に関する他の研究例では、高 CO₂ 下で樹木個体あたりの窒素固定量が増加した理由として、根粒のニトロゲナーゼ活性が上昇したため (Temperton et al. 2003)、根粒重量が増加したため (Hibbs et al. 1995)、その両方のため (Norby 1987; Arnone and Gordon 1990; Vogel et al. 1997) と様々な結果が報告されている。今回の研究では、高 CO₂ での個体あたりの窒素固定量の増加は、根粒の活性 (SNA) の上昇ではなく、高 CO₂ 下での成長促進に伴う根粒重量の増加が原因であることが示唆された。

次の節で結果を示すが、ケヤマハンノキの光飽和光合成速度は通常大気に比べて高 CO₂ 下で上昇した。高 CO₂ 下で光合成速度が上昇すると、根粒への光合成生産物の供給量が増加する (Tissue et al. 1997)。本研究では、高 CO₂ 下で光合成速度が上昇しても根粒 1 g あたりのニトロゲナーゼ活性が上昇せず、樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが示された。つまり、光合成生産物の供給量の増加により、根粒の活性ではなく、根粒形成量が増加したことが示唆された。

本研究では根粒のニトロゲナーゼ活性を実測していないため、High-N と Low-N では窒素固定量を推定することはできない。これまでの研究で高 CO₂ 下でも吸収する窒素の中で窒素固定由来の窒素の占める割合は通常大気の場合と変わらない (Vogel et al. 1997; Schortemeyer et al. 1999) ことが報告されている。樹木個体の総窒素含量がそれぞれの窒素処理で高 CO₂ 下で増加した (表 2) ことから、High-N と Low-N の個体でも N-free と同様に高 CO₂ 下で個体あたりの窒素固定量が増加したことが推察される。

表 1 ケヤマハンノキの樹木個体あたりの重量 (whole-plant mass)、葉重量 (leaf mass)、葉面積 (leaf area)。分散分析の結果を示す。ambient 通常 CO₂、elevated 高 CO₂。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、n.s. は $P > 0.1$ を示す

		High-N		Low-N		N-free		Source of variance		
		ambient	elevated	ambient	elevated	ambient	elevated	CO ₂	N	CO ₂ x N
Whole-plant mass	(g plant ⁻¹)	34.5 (3.7)	43.5 (5.7)	34.3 (3.2)	40.6 (3.0)	39.2 (5.0)	51.6 (2.5)	**	n.s.	n.s.
Leaf mass	(g plant ⁻¹)	13.1 (1.2)	16.3 (1.8)	12.6 (1.1)	14.8 (0.9)	14.3 (1.7)	17.7 (0.8)	*	n.s.	n.s.
Leaf area	(m ² plant ⁻¹)	0.37 (0.03)	0.42 (0.03)	0.34 (0.02)	0.40 (0.03)	0.43 (0.04)	0.50 (0.02)	*	*	n.s.

表 2 樹木個体の窒素増加量 (whole-plant N increment) と総窒素含量 (whole-plant N)。分散分析の結果を示す。ambient 通常 CO₂、elevated 高 CO₂。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、n.s. は $P > 0.1$ を示す。0.05 < $P < 0.1$ の場合は値を示した

		High-N		Low-N		N-free		Source of variance		
		ambient	elevated	ambient	elevated	ambient	elevated	CO ₂	N	CO ₂ x N
Whole-plant N increment	(g plant ⁻¹)	0.72 (0.07)	0.81 (0.09)	0.61 (0.05)	0.72 (0.06)	0.80 (0.08)	0.90 (0.04)	0.07	*	n.s.
Whole-plant N	(mg g ⁻¹)	21.4 (0.8)	19.2 (0.5)	18.5 (0.8)	18.0 (0.7)	20.9 (0.6)	17.7 (0.2)	***	*	n.s.

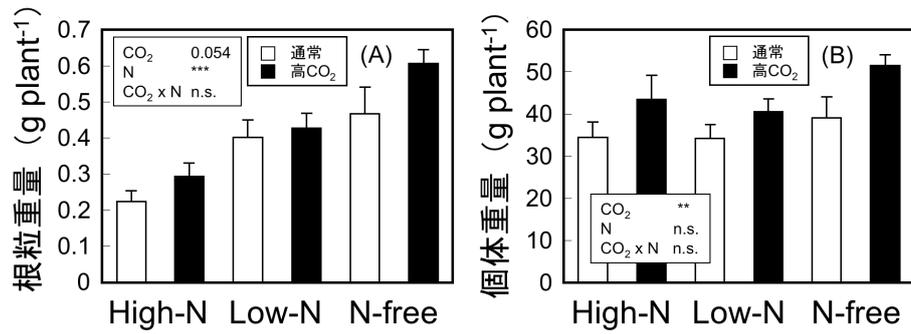


図1. 各処理の100日後の樹木個体重量 (A) と根粒重量 (B)

棒は標準誤差 (n = 6)。白 通常 CO₂、黒 高 CO₂。分散分析の結果を示す。*** $P < 0.001$ 、n.s.は $P > 0.1$ を示す

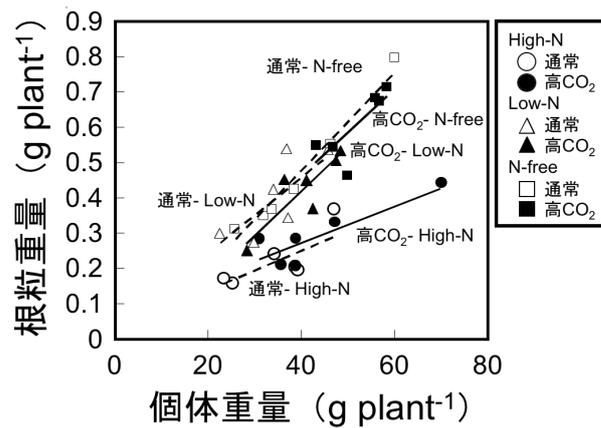


図2. 各処理の100日後の樹木個体重量と根粒重量の関係

白 通常 CO₂、黒 高 CO₂ ; ○ High-N、△ Low-N、□ N-free

3. 2 光合成特性に及ぼす高 CO₂ と窒素供給量の影響：ミズナラ、イタヤカエデとの比較

3. 2. 1 背景

短期的な応答では、現在の大気 CO₂ 濃度の上昇に伴い樹木の葉の光合成速度が上昇することが予想される。しかし、実際に樹木を高 CO₂ の環境下で生育させた場合、高 CO₂ 条件で測定した光合成速度が現状の CO₂ 濃度環境下で予想される値より低下する場合が多い (Nowak et al. 2004; Rogers and Ainsworth 2006)。この現象は光合成のダウンレギュレーションと呼ばれる。高 CO₂ 下で光合成のダウンレギュレーションが生じる原因の一つに、光合成生産物を生産する場所（ソース）の能力に対して利用する場所（シンク）の能力が不足し、葉内に余剰の炭水化物が蓄積することが挙げられる (Stitt and Krapp 1999; Long et al. 2004; Ainsworth and Long 2005; Ainsworth and Rogers 2007)。

土壌中の窒素供給量不足は、樹木の成長を抑制するため、シンクリミットの一つの原因となり、高 CO₂ に対する光合成反応を左右する要因の一つである (Rogers et al. 1998; Davey 1999; Adam 2000; Ainsworth and Rogers 2007)。葉の発達に伴い、樹体内のシンク・ソースバランスが変動するため、葉の発達段階は高 CO₂ に対する光合成応答と関連する (Nie et al. 1995a, 1995b; Reekie 1996; Miller et al. 1997; Wait et al. 1999; Kander et al. 2000; Lewis et al. 2002; Bernacchi et al. 2005; Davey et al. 2006; Roger and Ainsworth 2006)。葉の位置や葉齢 (Nie 1995a, 1995b; Osborne 1998; Adam 2000)、樹齢 (Körner 2003) なども、高 CO₂ に対する光合成の順化反応に影響を及ぼす。樹種間の開葉様式の違いは、葉の発達段階と密接に関連するため、樹体内のシンク・ソースバランスを左右し、高 CO₂ に対する光合成反応に影響を及ぼすことが予想される。例えば、固定成長 (determinant growth pattern) のような遺伝的な開葉の制限により高 CO₂ に対する光合成のダウンレギュレーション反応が加速された (Ainsworth et al. 2004; Long et al. 2004)。遷移系列上の位置の異なる樹種間では開葉様式が異なる場合が多いため (Kikuzawa 1983)、高 CO₂ に対する光合成の反応が異なる可能性がある。

ケヤマハンノキは順次開葉型の開葉様式を持つことに加え、根系に形成された根粒が光合成生産物のシンクとして機能するため、窒素固定能を持たない樹種や一斉開葉型の樹種に比べてシンク能が高いと考えられる。そのため、窒素固定樹種のケヤマハンノキは、高 CO₂ 下での光合成のダウンレギュレーションが少なく、理論的な予想に近い高 CO₂ 応答を示すかもしれない。そこで、ケヤマハンノキの高 CO₂ に対する光合成反応の特徴を明らかにするために、遷移系列上の位置と開葉様式が異なる窒素固定能を持たない樹種のミズナラとイタヤカエデを材料に用い、高 CO₂ に対する光合

成反応を調べた。次の 2 点を仮説とした。1. 遷移系列上の位置と開葉様式が異なる樹種間では、高 CO₂ に対する光合成の反応が異なる。2. ケヤマハンノキは順次開葉型の開葉様式を持つことに加え、根粒が光合成生産物のシンクとして機能するためシンク能が高く、光合成において理論的な予想に近い高 CO₂ に対する応答を示す。ミズナラは、遷移中期種でギャップ依存的な性質を持つ樹種である。通常、一斉開葉型を示すが、生育条件が良い場合は二次、三次伸長をする場合があるため、シンク能が断続的に変化する樹種と考えられる。イタヤカエデは、遷移後期種で耐陰性の高い樹種である。一斉型の開葉様式を示し、ミズナラに比べて成長速度が遅く、成長量も比較的少ないことから、他の 2 種に比べて相対的にシンク能が低い樹種と考えられる。

3. 2. 2 材料と方法

3. 2. 2. 1 材料と実験設定

ミズナラとイタヤカエデの 1 年生苗を、3. 1 節のケヤマハンノキと同様にポットに植栽した。ケヤマハンノキと同じ時期に、360 $\mu\text{mol CO}_2\text{mol}^{-1}$ (通常 CO₂、コントロールまたは 36 Pa) と 720 $\mu\text{mol CO}_2\text{mol}^{-1}$ (高 CO₂ または 72 Pa) の CO₂ 濃度に設定したチャンバーで 5 月中旬から生育させた。CO₂ 濃度処理ごとに 2 つのチャンバーを用いた。各樹種 12 個体をそれぞれのチャンバーで育てた。その中の 6 個体ずつを、窒素供給量を 52.5 mg N pot⁻¹ 週⁻¹ (High-N) とその 10 分の 1 の 5.25 mg N pot⁻¹ 週⁻¹ (Low-N) で育てた。

3 樹種とも北アジアの冷温帯林を構成する主要な落葉広葉樹であり、実生と成木間の環境ストレスに対する感受性は同程度である (Koike 1988)。ミズナラ (*Quercus mongolica*) は遷移中期の樹種で成熟した混交林の主要構成樹種である。イタヤカエデ (*Acer mono*) は遷移後期の樹種で一生のほとんどを森林林床でも耐えることができる。ミズナラはイタヤカエデと同じ一斉開葉型を示すが、生育環境条件が成長に好都合の場合、一生育期間の間に数回一斉開葉を行う場合がしばしばみられる (Ishizuka et al. 1988; Koike et al. 1997)。

3. 2. 2. 2 開葉速度

各樹種の開葉速度を調べるために、全個体の頂芽から出た葉の葉長と葉幅を追跡測定した。同時にクロロフィル量の指標となる SPAD 値 (SPAD 502, MINOLTA, Osaka, Japan) を測定した。開葉開始は、ケヤマハンノキは葉身が現れた時点、ミズナラは葉身が立ち上がった時点、イタヤカエデは

葉身が軸から離れた時点とした (Wesolowski and Rowinski 2006)。

3. 2. 2. 3 光合成特性

CO₂ 処理開始後に新たに開いた葉の光合成を携帯型光合成蒸散測定装置 (LI-6400, Li-cor, Lincoln, Nebraska, USA) を用いて測定した。葉長が最大になった直後の葉齢約 2 週間の未熟葉について、360 と 720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ の CO₂ 濃度で、飽和光下 (PPFD 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) での光合成速度を測定した。ケヤマハンノキではリーダーシュートの先端から 3 番目の葉がこの未熟葉に相当した。

葉齢約 1 ヶ月の成熟葉について、飽和光下 (PPFD 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) での葉内間隙 CO₂ 濃度 (C_i) と単位葉面積あたりの光合成速度 (A_{sat}) の関係を調べた。飽和光は光合成速度の光依存性の結果を基に決定した (データは示していない)。ケヤマハンノキではリーダーシュートの先端から 6 番目を成熟葉として測定した。ミズナラとイタヤカエデでは二次伸長葉を測定した。この測定は、それぞれ処理 59 日目 (ケヤマハンノキ)、57 - 65 日目 (ミズナラ)、50 - 52 日目 (イタヤカエデ) に行った。ミズナラは High-N の数個体が三次伸長を示した。ミズナラに関しては、三次伸長により新たなシンクが生じたときの高 CO₂ に対する光合成反応を明らかにするために、三次伸長期における葉齢約 1.5 ヶ月の成熟葉 (二次伸長葉) の光合成を測定した。通常の CO₂ 濃度 (360 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$) で測定を開始し、200、100、50 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ と下げた後、360、720、1500、1800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ へ上昇させ、8 点で測定した。葉温を 25°C、湿度を飽差が 1.2 kPa を超えないように調節した。Furquhar タイプの光合成生化学モデル (Furquhar et al. 1980) の式を用いて、25°C での最大炭酸同化速度 (V_{cmax}) と最大電子伝達速度 (J_{max}) を算出した。

$$A_{\text{area}} = V_{\text{cmax}} \times (C_c - \Gamma^*) / \{C_c + K_c \times (1 + O_i/K_o)\} - R_d. \quad (1)$$

$$A_{\text{area}} = J \times (C_c - \Gamma^*) / (4C_c + 8\Gamma^*) - R_d. \quad (2)$$

C_c は葉緑体内の CO₂ 濃度、 Γ^* は CO₂ 補償点、 K_c と K_o はカルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応のミカエリス定数、 O_i は細胞内 O₂ 濃度、 R_d は日中の呼吸速度 (day respiration) を意味する。(2) 式の J は電子伝達速度であり、飽和光条件下では J は J_{max} と等しくなる。この研究では、葉内の CO₂ 拡散制限を無視し、 C_i を C_c として用いた。モデル中の係数 K_c 、 K_o 、 Γ^* には、それぞれ 25°C の値として 404.9 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 、278.4 mmol mol^{-1} 、42.75 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ を用いた (Bernacchi et al. 2001)。 $A - C_i$ 関係を測定した葉について、 $C_i < 300$ の範囲について (1) 式を当てはめて V_{cmax} を算出した。 R_d は

V_{cmax} 推定時に算出した。また、 $C_i > 600$ の範囲について (2) 式を当てはめて J_{max} を算出した。

また、光合成の相対気孔リミテーションを Farquhar and Sharkey (1982) の式より求めた。

$$\text{相対気孔リミテーション (\%)} = (1 - P(C_i) / P(C_a)) \times 100 \quad (3)$$

$P(C_i)$ は葉内間隙の CO_2 濃度、 $P(C_a)$ は葉表面の CO_2 濃度

3. 2. 2. 4 葉内の窒素配分の間接的評価

Niinemets and Tenhunen (1997) で提案されたモデルを用いて、カルボキシラーゼ反応（主にルビスコ）への葉の窒素の配分係数 (F_r ; g N in Rubisco (g total leaf N)⁻¹) と、エネルギー伝達関連 (bioenergetic pools) への葉の窒素の配分係数 (F_b ; g N in cytochrome f, ferredoxin NADP reductase and coupling factor (g total leaf N)⁻¹) を算出した。 F_r と F_b は以下の式から算出した。

$$F_r = V_{\text{cmax}} / (6.25 V_{\text{cr}} \text{LMA} N_{\text{mass}}) \quad (4)$$

$$F_b = J_{\text{max}} / (8.06 J_{\text{mc}} \text{LAM} N_{\text{mass}}) \quad (5)$$

V_{cr} は単位ルビスコ量あたりの活性で、単位ルビスコあたりの活性は、 C_3 植物ではほぼ一定と報告されており (Woodrow and Berry 1988; Spreitzer 1999)、 $20.5 \mu\text{mol CO}_2 (\text{g Rubisco})^{-1} \text{s}^{-1}$ (25°C) (Jordan and Ogren 1984) を用いた。LMA は単位葉面積あたりの葉重量 (g m^{-2})、 N_{mass} は単位葉重量あたりの窒素含量 (g g^{-1})、6.25 は窒素含量をルビスコタンパク量に換算するときの比率 [$\text{g Rubisco (g N in Rubisco)}^{-1}$] を表す。 J_{mc} は単位シトクロム f (cytochrome f) あたりの光合成電子伝達能を表し、 $156 \text{ mol e}^- (\text{mol cyt f})^{-1} \text{s}^{-1}$ (25°C) を用いた (Niinemets and Tenhunen 1997)。 F_b の値は、シトクロム f、フェレドキシン NADP リダクターゼ (FNR)、共役因子 (ATP 合成酵素の一部) の量を反映する。共役因子は直線的な電子伝達速度を制限するタンパク質である (Evans and Seemann 1989)。シトクロム f : FNR : CF のモル比を 1 : 1 : 1.2 で一定と仮定すると、エネルギー伝達関連への窒素 1 g の投資は $8.06 \mu\text{mol cyt f}$ に相当する (Evans and Seemann 1989)。Frak et al. (2001) により上記二式を用いた推定方法では過小評価になることが指摘されている。この指摘を認識した上で、本研究では、他の研究と同様に (例えば Niinemets and Tenhunen 2004)、この計算式を窒素配分の指標として用いた。

3. 2. 2. 5 成熟葉の性質

光合成を測定した後、葉面積 (LI-3000A, Li-Cor Inc.)、葉の厚さと乾燥重量を測定し、窒素含量を NC アナライザー (SUMIGRAPH, NC-800, Sumika Chem. Anal. Service, Osaka, Japan) を用いて分析した。気孔密度を調べるために、スンプを用いて葉身の中央付近で気孔跡を葉一枚につき 1 枚とり、2 視野の測定値の平均を求め、4 枚の平均を算出した。光合成測定葉の非構造的炭水化物濃度を調べた。光合成を測定した葉について可溶性糖類とデンプンの分析を行った (Kabeya et al. 2003)。サンプル葉を 80°C で 48 時間乾燥後、粉砕した。葉の可溶性糖類は 80% エタノールで抽出し、フェノーラー硫酸法により定量した。残差中の葉のデンプン量は、水酸化カリウムで溶かし、amyloglucosidase (A9228, Sigma, St. Louis, Mo., USA) でグルコースにした。テストキットを用いてグルコース量を定量した (439-90901, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)。非構造的炭水化物濃度 (TNC) は、可溶性糖類とデンプンの合計として算出した。

3. 2. 2. 6 各器官のバイオマスと窒素含量

処理開始から 100 日後に各処理 6 個体ずつを刈り取り、葉面積、各器官 (葉、枝、幹、太根 (> 2 mm)、細根 (< 2 mm)) の乾燥重量を測定した。ケヤマハンノキについては、根粒重量も測定した。葉面積比 (LAR) と地上部/地下部比 (T / R 比) を計算した。25 個体を実験開始前にサンプリングし、初期個体重量の算出のために相対成長式を作成した。サンプル個体の各器官の窒素含量を NC アナライザー (SUMIGRAPH, NC-800) を用いて分析した。

3. 2. 2. 7 統計解析

スプリットプロットデザインの 2-way ANOVA で光合成特性 (A_{sat} , V_{cmax} , J_{max})、葉の性質 (LMA, N_{mass} , 単位葉面積あたりの窒素含量 (N_{area})) に及ぼす、CO₂ と窒素供給量の影響を解析した (JMP; SAS Institute 2003; $P < 0.05$)。 $P < 0.15$ を傾向があると解釈した。 V_{cmax} , J_{max} , N_{area} 間の関係の処理間差を、処理を要因として、共分散分析 (ANCOVA) で解析した。共変量には V_{cmax} や N_{area} を用いて解析した。ミズナラについては、二次伸長葉と三次伸長葉の結果をまとめて解析した。また、各器官の重量、葉面積の処理間差を、処理を要因として、ANCOVA で解析した。これらのパラメータはサイズ依存的であるため、個体総重量を共変量として解析した。いずれの場合も必ずしもパラメータ間で有意な相関を示さなかったため、2 つの窒素処理のデータをまとめて解析を行った。まず、処理 (CO₂) と共変量の間交互効果の検定を行った。もしこの交互効果が有意でない場合、交互効

果の項を除外して解析を続けた。

3. 2. 3 結果

3. 2. 3. 1 開葉速度

樹種や処理によらず約 2 週間で葉長が最大になり、CO₂ 処理は開葉速度に影響を及ぼさなかった（データは示していない）。3 種とも葉のサイズは開葉後 1 週間で最大に達した。ケヤマハンノキの SPAD 値は葉長が最大に達したときに最大になった。一方、ミズナラの SPAD 値は葉長が最大になった後も増加し続けた。

3. 2. 3. 2 光合成特性

開葉後約 2 週間の未熟葉の生育 CO₂ (通常 CO₂ は 360 μmol CO₂ mol⁻¹, 高 CO₂ は 720 μmol CO₂ mol⁻¹) で測定した光飽和光合成速度 ($A_{\text{sat-growth}}$) は 3 樹種とも高 CO₂ で高かった (表 1)。高 CO₂ と通常 CO₂ で生育した個体を比較すると、同じ CO₂ 濃度 (720 μmol CO₂ mol⁻¹) で測定した光飽和光合成速度 ($A_{\text{sat-720}}$) は、ケヤマハンノキでは High-N で高 CO₂ で生育した個体で低下する傾向を示した ($P = 0.15$)。ケヤマハンノキとミズナラの未熟葉の光合成速度は、Low-N で High-N より低下する傾向を示した。

開葉後約 1 ヶ月の成熟葉の $A_{\text{sat-growth}}$ は高 CO₂ のほうが高かった (図 1)。ケヤマハンノキの $A_{\text{sat-720}}$ は有意ではないが高 CO₂ で低下する傾向を示した ($P = 0.055$)。イタヤカエデの $A_{\text{sat-720}}$ は高 CO₂ のほうが有意に低かった。ミズナラの成熟葉の $A_{\text{sat-720}}$ は高 CO₂ で低下しなかったが (図 1)、葉齢 1.5 ヶ月の成熟葉では $A_{\text{sat-720}}$ が高 CO₂ で低下した (図 2)。ミズナラの High-N では、三次伸長の有無に関わらず $A_{\text{sat-720}}$ は高 CO₂ で低下した ($P < 0.001$; 図 2)。それぞれの生育環境の CO₂ 条件で測定した光合成速度の比 (高 CO₂ で生育した個体を 720 μmol CO₂ mol⁻¹ 測定した値 / 通常 CO₂ で生育した個体を 360 μmol CO₂ mol⁻¹ で測定した値) を、通常 CO₂ で生育した個体をそれぞれの生育環境の CO₂ 条件で測定した光合成速度の比 (通常 CO₂ で生育した個体を 720 μmol CO₂ mol⁻¹ 測定した値 / 通常 CO₂ で生育した個体を 360 μmol CO₂ mol⁻¹ で測定した値) と比較した。その結果、イタヤカエデとミズナラでは、開葉後 2 週間以降、葉齢と共に、それぞれの生育環境の CO₂ 条件で測定した光合成速度の比のほうが顕著な低下を示した (図 3)。一方、ケヤマハンノキでは、葉の成熟に伴う比の低下が顕著ではなかった。ケヤマハンノキの光合成速度では、通常 CO₂ に対する高 CO₂ の比は高

くなかったが、未熟なとき（2週間葉）から光合成速度の絶対値が高く、養分処理間の差が小さかった。一方、ミズナラとイタヤカエデの光合成速度では、通常 CO₂ に対する高 CO₂ の比が未熟葉の時点で高かったが、光合成速度が低かった。

成熟葉で測定した $A - C_i$ の関係から算出される光合成パラメータ (V_{cmax} , J_{max}) に対する高 CO₂ の影響は樹種や葉齢により異なった（図 4）。ケヤマハンノキは V_{cmax} のみ高 CO₂ で低下する傾向を示し（Low-N のみ有意）、 J_{max} は顕著な低下を示さなかった。イタヤカエデの V_{cmax} と J_{max} は高 CO₂ で有意に低下した。ミズナラの V_{cmax} と J_{max} は 1.5 ヶ月の高齢葉になると高 CO₂ で V_{cmax} と J_{max} の両方が低下した。ケヤマハンノキのみ V_{cmax} と J_{max} の関係に CO₂ 処理間で有意な差を示し、高 CO₂ 下で V_{cmax} に対する J_{max} が上昇した（ANCOVA, $P = 0.004$ ）（図 5, 表 2）。ミズナラとイタヤカエデでは、両者の関係に高 CO₂ による変化がなかった。

3. 2. 3. 3 水分特性と気孔反応

生育環境 CO₂ 濃度（通常 CO₂ は 360 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, 高 CO₂ は 720 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ）で測定した気孔コンダクタンスは、ミズナラの高齢葉（1.5 ヶ月葉）とイタヤカエデでは、通常 CO₂ に比べて高 CO₂ で有意に低下した（図 6）。同じ CO₂ 濃度で測定した気孔コンダクタンスは、CO₂ 処理間で大きな変化はなく、ミズナラの高齢葉の High-N のみ高 CO₂ で有意に低下した。

気孔密度は、高 CO₂ に対する統一的な反応は見られなかった（図 7）。ケヤマハンノキの Low-N とミズナラの High-N では、高 CO₂ で気孔密度が高くなる傾向、逆にミズナラとイタヤカエデの Low N では、高 CO₂ で気孔密度が低下する傾向を示した。処理に関わらずミズナラの気孔密度は高かった。

同じ CO₂ (360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) で算出した相対気孔リミテーションは、ケヤマハンノキで CO₂ の効果があり、高 CO₂ で高くなる傾向を示した ($P < 0.05$, 図 8)。ミズナラとイタヤカエデは、高 CO₂ 下で相対気孔リミテーションが増加する傾向を示す場合もあったが、いずれも有意な差ではなかった。

この Farquhar and Sharkey (1982) の式による結果は Jones (1998) の式を用いた結果でも同様の傾向が得られた。

3. 2. 3. 4 成熟葉の性質

ケヤマハンノキの単位葉面積当たりの窒素含量 (N_{area}) には高 CO₂ の効果があり ($P < 0.01$)、高 CO₂ で低下傾向を示した（表 3）。一方、ミズナラとイタヤカエデの N_{area} は、窒素処理の効果があったが、CO₂ 処理の影響はなかった。ただしミズナラの高齢葉（1.5 ヶ月葉）では高 CO₂ の効果があり ($P < 0.05$)、

高CO₂のHigh-Nで低下傾向を示した。ケヤマハンノキではLMAに対する高CO₂の影響は顕著でなかったが ($P = 0.057$)、葉の単位重量あたりの窒素含量 (N_{mass}) は窒素処理に関わらず高CO₂で有意に低下した ($P < 0.001$)。一方ミズナラとイタヤカエデでは、LMAが高CO₂で増加する傾向を示し (それぞれ $P < 0.001, P < 0.01$)、 N_{mass} も低下する傾向を示した (それぞれ $P < 0.001, P < 0.05$)。

葉の厚さに対して高CO₂の明瞭な効果はみられなかった (表3)。ケヤマハンノキの個葉面積には高CO₂の効果がみられ高CO₂で増大する傾向を示し ($P < 0.05$)、逆にミズナラの個葉面積では高CO₂で低下する傾向を示した ($P < 0.05$)。イタヤカエデでは高CO₂の有意な効果が見られなかった。SPAD値はイタヤカエデで高CO₂の効果があり ($P < 0.05$)、高CO₂で低下傾向を示し、吸光度が高CO₂で低下した。

3. 2. 3. 5 成熟葉の窒素含量と光合成特性の関係

3樹種で N_{area} と V_{cmax} の関係にCO₂処理間の有意差がみられ、高CO₂で N_{area} に対する V_{cmax} が低下する傾向を示した (図9, 表2)。葉の N_{area} と J_{max} の関係でもケヤマハンノキ以外ではCO₂処理間の有意差を示したが、ケヤマハンノキでは葉の N_{area} と J_{max} の関係にCO₂の効果はみられなかった (表2)。

ケヤマハンノキでは C_i と光合成の窒素利用効率 (PNUE) の関係 (PNUE- C_i) がCO₂処理間で変化しなかった (図10)。イタヤカエデは高CO₂でPNUEが大幅に低下した。ミズナラも1ヶ月葉まではPNUEが変化しなかったが、葉齢が高くなる (1.5ヶ月葉) と高CO₂で低下した (図11)。低下の程度はミズナラよりイタヤカエデのほうが大きかった。

3. 2. 3. 6 成熟葉内の窒素配分

成熟葉の光合成パラメータ ($V_{\text{cmax}}, J_{\text{max}}$) から推定した光合成機能に対する葉内の窒素配分比 (F_r, F_b) に対する高CO₂の影響は、光合成パラメータの反応を反映して樹種や葉齢により異なった (表4)。ミズナラの高齢葉 (1.5ヶ月) とイタヤカエデでは、高CO₂で F_r が有意に低下した。また F_b はミズナラとイタヤカエデで、高CO₂で低下する傾向を示した。一方、ケヤマハンノキでは、 F_r と F_b に対する高CO₂の効果はみられなかった。LMAと光合成機能に対する窒素配分比の合計 ($F_r + F_b$) との関係は、3樹種ともLMAの増加に対して ($F_r + F_b$) が低下する傾向を示した (図12)。高CO₂でのLMAの増加の程度が大きいミズナラとイタヤカエデは、ケヤマハンノキに比べて ($F_r + F_b$) の低下の程度が大きい傾向を示した。

3. 2. 3. 7 成熟葉の TNC 含量

成熟葉中の非構造的炭水化物 (TNC) 濃度は、ケヤマハンノキでは顕著な変化を示さず、ミズナラ (1.5 ヶ月葉) で有意に高 CO₂ で増加し、イタヤカエデでも高 CO₂ で増加する傾向を示した (表 5)。可溶性糖類 (soluble sugar) 濃度の顕著な変化は見られず、デンプン (starch) 濃度の増加が TNC 濃度の変化に対応した。ミズナラでは窒素処理間の差が大きく、Low-N で High-N より TNC 濃度が高くなった。以上の傾向は、単位面積あたりの TNC 量 (TNC_{area}) とデンプン含量 (starch_{area}) でもみられた。ただし、重量あたりの濃度と異なり単位面積あたりの可溶性糖類含量 (soluble sugar_{area}) は、ミズナラで有意に高 CO₂ で増加し、イタヤカエデでも高 CO₂ で増加する傾向を示した (表 5)。TNC_{area} は LMA との間に有意な正の相関を示した。3 樹種の高 CO₂ に対する TNC_{area} と LMA の変化幅を比較した結果、LMA の増加量の 41% から 61% を TNC_{area} の増加量で占めていた。また TNC_{area} は N_{mass} 、 V_{cmax} 、 J_{max} との間に負の相関を示した (結果は示していない)。

3. 2. 3. 8 成長とバイオマス配分

樹木個体のバイオマス総量の100日間の相対成長率は、ケヤマハンノキでは窒素処理に関わらず高 CO₂ 下で高かった ($P = 0.046$) が、ミズナラではCO₂ と窒素処理間で交互効果があり ($P = 0.047$)、Low-N ではCO₂ 処理間で差がなかった (表6)。イタヤカエデはHigh-Nでも成長が促進されなかった。バイオマス配分に対する高CO₂ の影響は小さかった。ケヤマハンノキの葉面積比 (LAR) は処理の影響を受けなかったが、ミズナラのLAR は高CO₂ で低下する傾向を示した ($P = 0.057$)。また、ミズナラとイタヤカエデのLAR には窒素処理の効果があり、ミズナラのLAR はLow-N で低下し ($P = 0.006$)、イタヤカエデのLAR はLow-N で増加する傾向 ($P = 0.038$) を示した。T / R 比には3種とも高CO₂ による影響はみられなかったが、ミズナラでは窒素処理の効果があり、Low-N で低下した ($P < 0.0001$)。幹の直径は、ケヤマハンノキでは窒素処理の有意な効果がなく、高CO₂ で幹直径が増大する傾向を示した ($P = 0.059$)。ミズナラの幹直径は、CO₂ の効果と窒素処理の効果がいずれも有意であり、高CO₂ で増加しLow-N で減少した。

3. 2. 4 考察

3. 2. 4. 1 葉齢と光合成反応

光合成におけるシンク・ソースバランスの変化は、葉内の炭水化物 (糖類) 蓄積を通じて葉の光

合成を制御する重要な要因の一つとなる (Kasai 2008)。高 CO₂ 下でも土壌養分不足などにより、光合成のソースに対してシンクが不足する場合に光合成のダウンレギュレーションを生じやすくなる (Ainthwarth and Rogers 2007)。また、シンク・ソースバランスと関連して、葉齢や葉の発達段階 (Nie et al.; 1995a, 1995b; Reekie 1996; Miller et al. 1997; Osborne 1998; Wait et al. 1999; Adam 2000; Kander et al. 2000; Lewis et al. 2002; Bernacchi et al. 2005; Davey et al. 2006; Rogers and Ainsworth 2006) により高 CO₂ に対する光合成活性の反応が異なる。例えば、*Populus* では、未熟葉では高 CO₂ 下での光合成の低下を示さず、葉の成熟後に光合成のダウンレギュレーションを示した (Wait et al. 1999)。本研究でも、高 CO₂ 下での光合成活性の低下の大きさは葉の成熟段階により、また、遷移系列上の位置の異なる樹種により異なった (図 1-4)。ミズナラとイタヤカエデでは開葉後 2 週間の未熟葉において光合成活性の大きな低下がなく、成熟葉で光合成活性の低下を示した。また、イタヤカエデのほうがミズナラより早い段階 (葉齢 1 ヶ月の時点) に光合成のダウンレギュレーションが生じた (図 2)。しかもイタヤカエデは High-N でも光合成能の低下を示し、窒素不足のみが高 CO₂ における光合成能の低下の原因ではないことが推察された。固定成長 (determinant growth pattern) のような遺伝的な開葉の制限により光合成のダウンレギュレーション反応が加速されるという報告があることから (Ainsworth et al. 2004; Long et al. 2004)、イタヤカエデの一斉開葉の性質によるシンクリミットが影響している可能性が考えられた。

ミズナラはイタヤカエデよりも高齢葉 (1.5 ヶ月葉) で光合成のダウンレギュレーションを示したが、予想に反してミズナラの三次伸長時にも光合成のダウンレギュレーションが生じた (図 2)。高 CO₂ 下で葉内の糖類の蓄積が生じていたことから (表 5)、三次伸長のみではソース・シンクバランスが調整できなかったことが示唆された。

一方で、成長期間を通じて当年枝を伸長させ葉の生産を続けるケヤマハンノキでは、葉齢 2 週間の葉で高 CO₂ 下での光合成能力の低下が確認されたが、葉齢の上昇に伴う大幅な光合成のダウンレギュレーションは生じなかった (表 1, 図 2, 4, 5)。ケヤマハンノキの高 CO₂ 下での光合成能力の低下が他の 2 樹種に比べて顕著でなかったことは、1. 成長期間を通じて当年枝を伸長させ葉を生産し続ける順次開葉型の開葉様式を持つことと、2. 根粒形成や根粒による窒素固定のためのエネルギー源として光合成産物を利用すること、により成長期間を通じてシンク能を高く維持することができることが影響していると考えられる。高 CO₂ 下での葉内の糖類の蓄積が不明瞭であったこと (表 5) からケヤマハンノキのシンク能の大きさが示唆された。

3. 2. 4. 2 成長反応と光合成反応

樹木個体重量の相対成長速度 (RGR) の結果から、高 CO_2 に対する光合成反応の葉齢に伴う違いが成長量にも反映されることが示唆された。3. 1 節でも示したように、ケヤマハンノキの個体の成長量は窒素供給量によらず高 CO_2 下で増加し (図 1、表 1; 3. 1 節)、RGR も同様に高 CO_2 で増加した (表 6)。この高 CO_2 に対する成長反応の結果はケヤマハンノキの高 CO_2 下での光合成活性の低下が明瞭でなかったこと (図 1, 3, 4) を反映している。また、ミズナラは葉齢 1.5 ヶ月の成熟葉では光合成のダウンレギュレーションを示したが、光合成速度が未熟葉の時の約 3 倍高くなる 1 ヶ月葉の成熟葉でも高 CO_2 で高い光合成速度を保つため、成長量の増加が予想された。一方、イタヤカエデは光合成速度が未熟葉の時の約 2 倍に上昇する成熟時には、すでに大幅な光合成のダウンレギュレーションが生じていたため高 CO_2 下での成長量の増加は期待できなかった。また、ミズナラは、Low-N の光合成速度が High-N に比べて成熟時も顕著に低く、高 CO_2 での光合成の上昇程度も少ない傾向であるため、High-N に比べて Low-N では成長量の増加は期待できなかった。Wait et al. (1999) の模式的なモデルで提示されたように、葉の発達に伴い、どの段階でどの程度光合成活性が高 CO_2 下で低下するのかということが成長反応に影響を及ぼすことが示唆された。

葉齢に伴う光合成のダウンレギュレーションの変化は連年の CO_2 処理でも見られる現象であり、シュート・葉の成長時期 (シンクの大きさ) との関連があることが Norway spruce の 6 年間の CO_2 処理の結果で示されている (Urban 2003)。本研究でも、翌春に同様の測定をした結果、やはり葉齢に伴う光合成反応の変化を確認することができた (データを示していない)。これらの結果から、樹種による葉齢に伴う高 CO_2 に対する光合成の変化の違いは、高 CO_2 下での成長量の違いに反映されることが予想される。

3. 2. 4. 3 葉内の窒素配分

樹木の光合成の順化は葉の窒素含量の低下や葉内の窒素配分の変化と関連している (Ceulemans and Mousseau 1994; Ceulemans et al. 1999; Medlyn 1999; Norby 1999; Temperton 2003)。理論上の最適窒素配分によると、 CO_2 が高い環境ではルビスコへの配分を減らし、他の光合成器官に窒素を配分するほうが有利と考えられる (Drake et al. 1997; Makino et al. 1997; Hikosaka and Hirose 1998; Long et al. 2004)。この最適窒素配分に従うと、 V_{cmax} に関わる酵素が減少し、 J_{max} に関わる酵素 (Rogers 1999; Harrison 2001) が上昇することが予想される。しかし、実際に高 CO_2 環境で生育した場合に、理論的な反応を示す例はほとんど示されていない (Medlyn et al. 1999)。Long et al. (2004) は、高 CO_2 に対

する光合成反応に関して二つの異なる概念を示した。一つは、ヘキソース循環 (Hexose-cycling) と呼ばれ、炭水化物蓄積により生じたシグナルによりルビスコの選択的減少が生じる (Moore et al. 1999) という概念である。もう一つは、葉の窒素含量の非選択的減少 (Jacob 1995; Makino et al. 1997; Sicher 1997; Curtis et al. 2000) と呼ばれ、植物体内の窒素の再配分や、窒素不足の植物で葉の老化が早くなることで葉のタンパク質全体が減少し、その結果ルビスコも減少するという概念である。ヘキソース循環の選択的減少では J_{\max} / V_{\max} の比は上昇する (Rogers et al. 1998) が、非選択的減少では J_{\max} / V_{\max} の比は一定である。今回のケヤマハンノキの結果では、 J_{\max} の高 CO_2 に対する変化が V_{\max} に比べて小さく、 J_{\max} / V_{\max} 比が上昇したことから、理論的な最適窒素配分に近い反応を示すことが示唆された (図 2, 4)。具体的には、葉内窒素の光合成系内のルビスコタンパクが減少し、ルビスコタンパクに対する電子伝達系の構成要素に対する配分比が変化したことが示唆された。Long et al. (2004) は、 V_{\max} が低下しても生育環境での光飽和光合成速度が低下しなければ、順化 (acclimation) と呼んでいる。ケヤマハンノキの反応は高 CO_2 に対する“順化”反応と呼べるかもしれない。ハンノキ属樹種の高 CO_2 に対する光合成反応の研究例では、火山灰土壌などの貧栄養土壌で通常 CO_2 濃度条件に比べて光合成能力の低下 (光合成のダウンレギュレーション) を示さなかったことが報告されている (Vogel and Curtis 1995; Eguchi et al. 2008)。しかし、いずれの報告でも、 $A - C_i$ 関係の変化がほとんどなく、最適窒素配分のような理論的なモデルで指摘されているような高 CO_2 に対する順化反応は示されていない。それぞれの研究の間で、高 CO_2 処理の濃度や土壌養分等の条件が同じではないことが反応の違いに繋がっているのかもしれない。本研究で示されたケヤマハンノキの高 CO_2 に対する光合成反応は、より窒素固定樹種としての特殊性を表す反応でなのではないかと推察される。

一方、イタヤカエデや、ミズナラの高齢葉では光合成活性は高 CO_2 下で顕著に低下した。ケヤマハンノキと異なり、これら 2 種は高 CO_2 下で V_{\max} と J_{\max} とともに低下し、 J_{\max} / V_{\max} 比が変化しなかったため (図 4, 5)、葉内の光合成系内での窒素配分の変化はないことが示唆され、非選択的減少の概念に近い反応を示した。気孔コンダクタンスの低下は、光合成の低下の原因の一つと考えられる (特にミズナラ高齢葉の High-N) が、今回の実験では主要な原因ではないと考えられた (図 6)。

窒素不足の場合、高 CO_2 下でルビスコを生成する遺伝子の発現が減少する (Van Oosten 1995) という報告があるが、ルビスコの量の変化なしに、不活性化した形態のものが増加すること (Woodrow 1994) や、過剰の窒素をルビスコとして貯蔵する場合もある。マメ科の場合でも、ルビスコ含量ではなくルビスコ活性の低下が生じたという報告がある (Rogers and Ainthworth 2006)。 V_{\max} の低下はルビスコ量の低下だけでなく、ルビスコ活性の低下を示す場合もあることを認識しておく必要がある。

る。

3. 2. 4. 4 光合成の窒素利用効率の変化

葉内の窒素を、光合成機能から、光合成以外の成長や被食防衛のための窒素を含む二次代謝産物(アルカロイドなど; Lindroth 2010) に再配分する場合がある (Gleadow et al. 1998)。ケヤマハンノキは、同じ CO_2 濃度で測定した値で比較した場合に高 CO_2 でも窒素利用効率 (PNUE; 光飽和光合成速度 / 葉内の窒素含量) が変化しなかった (図 10)。この結果から、ケヤマハンノキでは光合成系へ配分される葉内窒素の割合が高 CO_2 下で変化しなかったこと、二次代謝産物のような光合成機能以外への窒素配分の増加が生じなかったことが示唆された。以上の結果は窒素処理によらず、さらに葉齢によらず同様の傾向を示しており、大変興味深い結果であった。窒素を含んでいない被食防衛物質に関する Koike et al. (2006) の結果では、ケヤマハンノキの成熟葉内に含まれる縮合タンニンが、土壤中の窒素供給量が多い場合のみ高 CO_2 下で増加したが、総フェノールは逆に窒素供給量に関わらず高 CO_2 下で減少した。葉に含まれる縮合タンニン量は総フェノール量に比べて少量であり、ケヤマハンノキでは高 CO_2 下で二次代謝産物が増加しないことが示唆されている (Koike et al. 2006)。

一方、イタヤカエデとミズナラでは高 CO_2 で PNUE が低下し (図 10, 11)、 $J_{\max} / V_{\text{cmax}}$ 比が変化しなかったため (図 5)、葉内窒素配分の変化により光合成系以外へ配分される葉内窒素の割合が増加したことが示唆された。Koike et al. (2006) は、窒素不足の場合にミズナラとイタヤカエデの縮合タンニンと総フェノールが高 CO_2 で増加すること、また窒素供給が多い場合にイタヤカエデの総フェノール量が高 CO_2 で増加することを示した。窒素を含まない被食防衛物質の結果であるが、今回対象とした 3 樹種間で成熟葉内の被食防衛物質の高 CO_2 応答に違いがあることが示されている。

3. 2. 4. 5 成熟葉の性質の変化

LMA の増加と単位重量あたりの窒素含量の低下の大きさの違いが単位面積あたりの窒素含量の低下に影響する (Luo 1994)。ケヤマハンノキの成熟葉では高 CO_2 による LMA の変化が少なく N_{mass} が顕著に低下した結果、 N_{area} に低下傾向が見られたと考えられる (表 3)。ミズナラとイタヤカエデは高 CO_2 による LMA の増加と N_{mass} の低下の両者の変化が相殺され N_{area} の変化は、特にイタヤカエデで顕著に見られなかった。ミズナラとイタヤカエデでは N_{area} が低下しない場合でも光合成のダウンレギュレーションは生じた。サンプリングした葉では高 CO_2 下での非構造的炭水化物 (TNC) 量の増加が、LMA の高 CO_2 による増加分の約 41% から 61% を占め (表 3, 5)、 TNC_{area} と LMA の

間に正の相関関係を示した（データを示していない）。また、 TNC_{area} と V_{cmax} や J_{max} の間にも負の相関を示した（データを示していない）。LMA は細胞壁の厚さ (Niinemets 1997) や細胞壁の物質量 (Onoda 20004; Takashima 2004) だけでなく、構造的タンパク質への葉内窒素の配分量とも相関がある (Yasumura et al. 2006)。LMA の増加に対して、光合成機能に対する窒素配分比の合計 ($F_r + F_b$) が低下する傾向を示し、高 CO_2 での LMA の増加の程度が大きいミズナラとイタヤカエデが、($F_r + F_b$) の低下の程度が大きい傾向を示した (図 12)。LMA を構造的な窒素量の指標、($F_r + F_b$) を可溶性（代謝系）窒素量の指標と考えると、3 樹種の高 CO_2 に対する葉内の窒素配分の変化の仕方が各樹種の光合成能力 (V_{cmax} , J_{max}) の高 CO_2 応答に影響を及ぼした可能性がことが示唆された。

3. 2. 4. 6 ポット試験の結果の解釈

ポット実験では、ポット効果と呼ばれる根の成長の物理的制限が問題になる (Arp 1991)。今回の実験で、イタヤカエデは窒素処理に関わらず高 CO_2 下での成長促進効果を示さなかった。イタヤカエデは他の 2 種に比較して刈り取り時の樹木個体サイズが小さく、物理的に根の成長が抑制されている状況ではなかった（観察のみ）。イタヤカエデでは窒素供給量にかかわらず顕著に光合成のダウンレギュレーションが生じ (図 1, 3, 4)、成長が抑制された (表 6)。これらの結果から、今回示したイタヤカエデの反応は、ポット効果によるものではなく、高 CO_2 に対する種特異的な反応と判断することができると考えた。野外の FACE 実験でもイタヤカエデの光合成・成長反応について同様の高 CO_2 応答の傾向が示された (Eguchi et al. 2008) ことから、今回の結果が単なるポット効果でないことが支持される。実験室レベルの結果をそのまま野外の自然条件での高 CO_2 応答に当てはめることはできないが、各樹種の高 CO_2 応答の傾向を提示することができたのではないかと考える。

3. 2. 4. 7 まとめ

高 CO_2 に対する光合成反応は、葉齢により異なり、変化の時期や程度は、遷移系列上の位置と開葉様式が異なる 3 樹種間で異なり、高 CO_2 に対する各樹種の成長反応に影響することが示唆された。成熟葉の光合成速度は、ケヤマハンノキでは窒素処理によらず高 CO_2 での低下が少なく、一方、イタヤカエデの光合成速度は窒素処理によらず高 CO_2 下で大幅に低下した。ミズナラも高 CO_2 で光合成速度が低下したが、イタヤカエデに比べると低下が生じる時期が遅かった。ミズナラの光合成速度は、Low-N で High-N より大幅に低下し、他の 2 種に比べて窒素依存性が高いことがわかった。成長反応では、ケヤマハンノキは窒素処理によらず高 CO_2 下で相対成長率 (RGR) が上昇し、イタ

ヤカエデは窒素処理によらず高 CO₂ 下で RGR が増加せず、ミズナラは窒素が充分ある場合のみ高 CO₂ 下で RGR が上昇した。この実験では、葉面積比 (LAR) が高 CO₂ で増加することはなかったため、高 CO₂ に対する成長反応は、高 CO₂ に対する光合成特性の応答を反映した結果となった。以上の結果から、光合成特性の高 CO₂ に対する応答が、開葉様式や樹種特性に関連している可能性が示唆された。

ケヤマハンノキの高 CO₂ に対する光合成反応でも V_{cmax} の低下が生じたが、他の 2 種に比べて J_{max} の低下が顕著でなかったため、生育環境の CO₂ 濃度条件下での光合成速度が高 CO₂ で上昇した。この反応は理論的な予想に近い高 CO₂ 応答であり、順次開葉型の開葉様式を持つことに加え、根粒が光合成生産物のシンクとして機能するため、ケヤマハンノキのシンク能が高いことが原因として考えられた。ケヤマハンノキは、高 CO₂ でも窒素利用効率 (PNUE; 光飽和光合成速度/葉内の窒素含量) が変化せず、光合成系へ配分される葉内窒素の割合が高 CO₂ 下で変化しないことも示唆された。他の 2 種では高 CO₂ で PNUE が低下したため、光合成系以外へ配分される葉内窒素の割合が増加したことが示唆された。

表 1 ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*)、ミズナラ (*Quercus mongolica*)、イタヤカエデ (*Acer mono*) の未熟葉 (約 2 週間) の光飽和光合成速度。各処理の葉を $360 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ と $720 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ で測定した値を示す。各処理区の平均値 (標準誤差) を示す ($n=6$)。CO₂ 処理 (通常 CO₂; ambient, 高 CO₂; elevated) と N 処理 (High-N, Low-N) に対して行った分散分析の結果 (P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P>0.15$)

		High-N		Low-N		Source of variance		
		ambient	elevated	ambient	elevated	CO ₂	N	CO ₂ x N
<i>Alnus hirsuta</i>	360 ppm	12.79 (0.65)	11.90 (0.61)	11.75 (0.46)	10.62 (0.52)	0.15	0.06	0.84
	720 ppm	17.93 (0.44)	16.05 (0.60)	16.06 (0.54)	15.14 (0.49)	0.22	0.010	0.34
<i>Quercus mongolica</i>	360 ppm	4.38 (0.53)	5.55 (0.83)	3.25 (0.31)	3.34 (0.48)	0.57	0.010	0.37
	720 ppm	7.10 (0.73)	8.18 (1.08)	5.28 (0.38)	4.95 (0.90)	0.80	0.005	0.40
<i>Acer mono</i>	360 ppm	3.38 (0.30)	3.55 (0.41)	3.47 (0.11)	4.02 (0.53)	0.36	0.41	0.59
	720 ppm	5.39 (0.35)	5.46 (0.48)	5.35 (0.19)	6.34 (0.81)	0.66	0.43	0.40

表 2 ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*)、ミズナラ (*Quercus mongolica*)、イタヤカエデ (*Acer mono*) の最大炭酸固定速度 (V_{cmax})、最大電子伝達速度 (J_{max})、葉の窒素含量 (N_{area}) 間の関係。CO₂ 処理 (通常 CO₂; ambient CO₂, 高 CO₂; elevated CO₂) ごとの関係式 (単回帰) を示した。 V_{cmax} 、 J_{max} 、 N_{area} 間の関係の CO₂ 処理間差を、処理を要因として、共分散分析 (ANCOVA) で解析した。共変量には V_{cmax} や N_{area} を用いて解析した。2 つの N 処理 (High-N, Low-N) をまとめて解析した。ミズナラ (*Quercus mongolica*) については、二次伸長葉と三次伸長葉の結果をまとめて解析した

Species	Ambient CO ₂	R^2	n	Elevated CO ₂	R^2	n	ANCOVA
Regressions of J_{max} against V_{cmax}							
<i>Alnus hirsuta</i>	$1.3 V_{\text{cmax}} - 3.0$	0.772	12	$1.3 V_{\text{cmax}} + 6.8$	0.769	12	0.004
<i>Quercus mongolica</i>	$1.7 V_{\text{cmax}} - 0.3$	0.985	25	$1.6 V_{\text{cmax}} + 6.3$	0.966	26	0.157
<i>Acer mono</i>	$1.9 V_{\text{cmax}} - 2.7$	0.669	13	$1.3 V_{\text{cmax}} + 23.0$	0.880	13	0.808
Regressions of V_{cmax} against N_{area}							
<i>Alnus hirsuta</i>	$21.0 N_{\text{area}} + 35.5$	0.172	12	$38.6 N_{\text{area}} + 6.3$	0.325	12	0.014
<i>Quercus mongolica</i>	$37.2 N_{\text{area}} + 2.6$	0.987	25	$34.1 N_{\text{area}} + 1.5$	0.936	26	0.004
<i>Acer mono</i>	$17.5 N_{\text{area}} + 25.4$	0.547	13	$5.1 N_{\text{area}} + 26.3$	0.018	13	<.0001
Regressions of J_{max} against N_{area}							
<i>Alnus hirsuta</i>	$29.6 N_{\text{area}} + 42.6$	0.147	12	$32.3 N_{\text{area}} + 36.9$	0.101	12	0.613
<i>Quercus mongolica</i>	$63.2 N_{\text{area}} + 4.9$	0.979	25	$56.0 N_{\text{area}} + 6.9$	0.962	26	0.041
<i>Acer mono</i>	$44.1 N_{\text{area}} + 35.3$	0.641	13	$10.1 N_{\text{area}} + 52.3$	0.040	13	0.0004

表 3 ケヤマハンノキ (*Alnus*)、ミズナラ (*Quercus*)、イタヤカエデ (*Acer*) の各処理における単位葉面積あたりの葉重量 (LMA, g m^{-2})、単位葉重量あたりの窒素含量 (mass based leaf N; N_{mass} , mg g^{-1})、単位葉面積あたりの窒素含量 (area based leaf N; N_{area} , g m^{-2})、葉の厚さ (Thickness, mm)、SPAD 値 (SPAD value)、個葉面積 (LA; m^2)。各処理区の平均値 (標準誤差) を示す ($n = 6$)。CO₂ 処理 (ambient; 通常 CO₂, elevated; 高 CO₂) と N 処理 (High-N, Low-N) に対して行った分散分析の結果 (P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)。ミズナラの * 印 (*Quercus**) は 1.5 ヶ月葉の結果を示す

		High-N		Low-N		Source of variance			
		ambient	elevated	ambient	elevated	CO ₂	N	CO ₂ x N	
LMA	(g m ⁻²)	<i>Alnus</i>	37.10 (1.57)	40.21 (1.78)	37.55 (1.86)	41.32 (1.58)	0.057	n.s.	n.s.
		<i>Quercus</i>	55.59 (1.38)	69.03 (4.16)	57.93 (1.86)	73.00 (2.70)	<0.0001	n.s.	n.s.
		<i>Quercus*</i>	64.34 (1.66)	71.27 (2.12)	63.37 (1.70)	78.85 (2.79)	0.0001	n.s.	0.096
		<i>Acer</i>	42.70 (1.22)	51.24 (2.55)	41.15 (1.53)	48.30 (2.77)	0.002	n.s.	n.s.
mass based leaf N	(mg g ⁻¹)	<i>Alnus</i>	35.98 (0.81)	30.10 (0.48)	34.28 (1.33)	27.25 (0.83)	<0.0001	0.022	n.s.
		<i>Quercus</i>	27.22 (1.24)	22.17 (1.39)	11.65 (0.36)	9.31 (0.22)	0.0008	<0.0001	n.s.
		<i>Quercus*</i>	29.80 (1.34)	23.55 (1.42)	10.81 (0.36)	8.36 (0.31)	0.0003	<0.0001	0.081
		<i>Acer</i>	26.12 (2.03)	21.73 (1.07)	20.58 (1.47)	17.02 (1.17)	0.013	0.002	n.s.
area based leaf N	(g m ⁻²)	<i>Alnus</i>	1.33 (0.06)	1.21 (0.05)	1.28 (0.05)	1.12 (0.03)	0.005	0.146	n.s.
		<i>Quercus</i>	1.52 (0.09)	1.51 (0.06)	0.67 (0.02)	0.68 (0.02)	n.s.	<0.0001	n.s.
		<i>Quercus*</i>	1.92 (0.10)	1.66 (0.10)	0.68 (0.03)	0.66 (0.04)	0.076	<0.0001	0.13
		<i>Acer</i>	1.11 (0.09)	1.10 (0.03)	0.85 (0.08)	0.81 (0.05)	n.s.	0.0001	n.s.
Thickness	(mm)	<i>Alnus</i>	0.14 (0.002)	0.14 (0.001)	0.14 (0.001)	0.14 (0.003)	n.s.	0.058	n.s.
		<i>Quercus</i>	0.15 (0.005)	0.16 (0.005)	0.15 (0.007)	0.16 (0.005)	n.s.	n.s.	n.s.
		<i>Quercus*</i>	0.17 (0.005)	0.18 (0.004)	0.16 (0.009)	0.16 (0.003)	n.s.	n.s.	n.s.
		<i>Acer</i>	0.15 (0.003)	0.16 (0.007)	0.15 (0.006)	0.16 (0.008)	n.s.	n.s.	n.s.
SPAD value		<i>Alnus</i>	38.88 (0.69)	39.32 (0.55)	38.73 (1.01)	38.42 (0.87)	n.s.	n.s.	n.s.
		<i>Quercus</i>	34.93 (1.50)	38.66 (1.44)	20.05 (0.67)	20.48 (0.58)	0.075	<0.0001	n.s.
		<i>Quercus*</i>	42.04 (1.25)	41.94 (1.40)	21.05 (1.57)	20.80 (1.04)	n.s.	<0.0001	n.s.
		<i>Acer</i>	33.13 (0.58)	29.70 (1.13)	30.36 (1.66)	27.83 (1.40)	0.034	0.092	n.s.
leaf area	(cm ²)	<i>Alnus</i>	41.73 (1.68)	50.08 (3.04)	42.30 (2.67)	47.11 (4.18)	0.041	n.s.	n.s.
		<i>Quercus</i>	65.58 (5.74)	48.31 (3.68)	47.08 (3.03)	29.21 (6.03)	0.002	0.001	n.s.
		<i>Quercus*</i>	56.51 (7.33)	45.90 (6.14)	41.70 (3.30)	22.61 (2.29)	0.039	n.s.	n.s.
		<i>Acer</i>	30.76 (2.80)	27.03 (0.82)	30.16 (2.45)	31.48 (2.53)	n.s.	n.s.	n.s.

表 4 ケヤマハンノキ (*Alnus*)、ミズナラ (*Quercus*)、イタヤカエデ (*Acer*) の各処理における、カルボキシラーゼ反応 (主にルビスコ) への葉の窒素の配分係数 (F_r ; g N in Rubisco (g total leaf N)⁻¹) と、生体エネルギー関連 (bioenergetic pools) への葉の窒素の配分係数 (F_b ; g N in cytochrome f, ferredoxin NADP reductase and coupling factor (g total leaf N)⁻¹)。各処理区の平均値 (標準誤差) を示す ($n = 6$)。CO₂ 処理 (通常 CO₂; ambient, 高 CO₂; elevated) と N 処理 (High-N, Low-N) に対して行った分散分析の結果 (P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)。ミズナラの*印 (*Quercus**) は 1.5 ヶ月葉の結果を示す

		High-N		Low-N		Source of variance		
		ambient	elevated	ambient	elevated	CO ₂	N	CO ₂ x N
Fr	<i>Alnus</i>	0.387 (0.015)	0.360 (0.010)	0.369 (0.018)	0.328 (0.017)	n.s.	0.107	n.s.
	<i>Quercus</i>	0.305 (0.007)	0.274 (0.013)	0.319 (0.004)	0.284 (0.013)	n.s.	0.147	n.s.
	<i>Quercus*</i>	0.296 (0.009)	0.258 (0.010)	0.327 (0.010)	0.264 (0.015)	0.046	0.154	n.s.
	<i>Acer</i>	0.304 (0.015)	0.223 (0.018)	0.395 (0.017)	0.301 (0.031)	0.0006	0.0007	n.s.
Fb	<i>Alnus</i>	0.051 (0.003)	0.052 (0.003)	0.049 (0.002)	0.050 (0.003)	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	0.052 (0.002)	0.048 (0.001)	0.054 (0.001)	0.053 (0.003)	0.147	0.070	n.s.
	<i>Quercus*</i>	0.047 (0.001)	0.043 (0.001)	0.053 (0.002)	0.049 (0.003)	0.077	0.010	n.s.
	<i>Acer</i>	0.061 (0.003)	0.045 (0.003)	0.070 (0.003)	0.061 (0.005)	0.077	0.004	n.s.

表 5 ケヤマハンノキ (*Alnus*)、ミズナラ (*Quercus*)、イタヤカエデ (*Acer*) の各処理における単位葉重量あたりの TNC (TNC, %)、デンプン (starch, %)、可溶性糖類 (soluble sugar, %)、単位葉面積あたりの TNC (TNC_{area}, g m⁻²)、デンプン (starch_{area}, g m⁻²)、可溶性糖類 (soluble sugar_{area}, g m⁻²)。各処理区の平均値 (標準誤差) を示す ($n = 4-9$)。CO₂ 処理 (通常 CO₂; ambient, 高 CO₂; elevated) と N 処理 (High-N, Low-N) に対して行った分散分析の結果 (P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)。ミズナラの*印 (*Quercus**) は 1.5 ヶ月葉の結果を示す

		High-N		Low-N		Source of variance		
		ambient	elevated	ambient	elevated	CO ₂	N	CO ₂ x N
TNC	<i>Alnus</i>	7.78 (1.43)	11.10 (2.13)	7.81 (1.18)	10.79 (1.48)	0.386	0.920	0.902
	<i>Quercus*</i>	7.64 (1.31)	12.58 (2.69)	15.39 (1.50)	20.12 (1.63)	0.003	0.001	0.930
	<i>Acer</i>	7.78 (1.36)	13.14 (2.59)	7.53 (1.42)	14.33 (2.80)	0.084	0.786	0.807
starch	<i>Alnus</i>	3.73 (1.32)	6.85 (1.87)	3.61 (0.89)	6.10 (1.28)	0.368	0.725	0.797
	<i>Quercus*</i>	1.44 (0.80)	5.48 (2.00)	9.28 (1.43)	14.08 (1.23)	0.002	<0.0001	0.988
	<i>Acer</i>	2.30 (0.98)	7.21 (2.65)	2.62 (1.35)	8.03 (3.00)	0.099	0.708	0.898
soluble sugar	<i>Alnus</i>	4.05 (0.17)	4.25 (0.36)	4.19 (0.37)	4.68 (0.30)	0.600	0.293	0.599
	<i>Quercus*</i>	6.19 (0.61)	7.09 (0.75)	6.11 (0.17)	6.58 (0.65)	0.341	0.735	0.766
	<i>Acer</i>	5.48 (0.72)	5.93 (0.34)	4.91 (0.23)	6.29 (0.92)	0.210	0.693	0.683
TNC _{area}	<i>Alnus</i>	2.96 (0.68)	4.57 (1.06)	3.02 (0.57)	4.55 (0.72)	0.355	0.979	0.962
	<i>Quercus*</i>	4.91 (1.12)	9.18 (2.15)	9.74 (1.38)	15.58 (1.42)	<0.0001	0.001	0.621
	<i>Acer</i>	3.37 (0.65)	7.03 (1.72)	3.12 (0.63)	7.22 (1.78)	0.075	0.989	0.921
starch _{area}	<i>Alnus</i>	1.46 (0.60)	2.86 (0.90)	1.42 (0.40)	2.60 (0.58)	0.359	0.793	0.851
	<i>Quercus*</i>	0.92 (0.64)	4.06 (1.54)	5.87 (1.16)	10.51 (0.99)	<0.0001	<0.0001	0.517
	<i>Acer</i>	0.99 (0.41)	4.00 (1.60)	1.11 (0.58)	4.24 (1.78)	0.122	0.811	0.944
soluble sugar _{area}	<i>Alnus</i>	1.50 (0.09)	1.71 (0.18)	1.60 (0.19)	1.95 (0.18)	0.395	0.275	0.621
	<i>Quercus*</i>	3.99 (0.53)	5.11 (0.66)	3.87 (0.23)	5.07 (0.56)	0.032	0.936	0.934
	<i>Acer</i>	2.38 (0.39)	3.03 (0.22)	2.01 (0.09)	2.98 (0.39)	0.108	0.331	0.883

表 6 ケヤマハンノキ (*Alnus*)、ミズナラ (*Quercus*)、イタヤカエデ (*Acer*) の各処理における個体重量における相対成長速度 (total W RGR, mg day^{-1})、葉面積比 (LAR, $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)、葉重比 (LWR, g g^{-1})、根重比 (RWR, g g^{-1})、細根率 (fine RWR/RW, g g^{-1})、地上部/地下部比 (T/R ratio)。各処理区の平均値 (標準誤差) を示す ($n = 6$)。CO₂ 処理 (通常 CO₂; ambient, 高 CO₂; elevated) と N 処理 (High-N, Low-N) に対して行った分散分析の結果 (P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)。ミズナラの*印 (*Quercus**) は 1.5 ヶ月葉の結果を示す

		High-N		Low-N		Source of variance		
		ambient	elevated	ambient	elevated	CO ₂	N	CO ₂ x N
total W RGR	<i>Alnus</i>	44.11 (0.88)	47.33 (1.31)	42.61 (1.26)	44.77 (1.12)	0.046	0.108	n.s.
	<i>Quercus</i>	20.57 (1.02)	26.19 (1.53)	17.03 (1.05)	17.55 (0.95)	0.066	<0.0001	0.047
	<i>Acer</i>	19.32 (0.85)	20.26 (1.67)	17.39 (1.06)	18.23 (1.13)	n.s.	0.144	n.s.
LAR	<i>Alnus</i>	109.61 (5.42)	99.03 (4.88)	102.07 (5.17)	99.56 (6.61)	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	34.34 (2.73)	27.89 (1.35)	26.83 (2.50)	21.03 (2.22)	0.057	0.006	n.s.
	<i>Acer</i>	25.26 (1.08)	24.82 (1.42)	29.70 (1.79)	28.56 (2.57)	n.s.	0.038	n.s.
LWR	<i>Alnus</i>	0.39 (0.014)	0.38 (0.007)	0.37 (0.006)	0.37 (0.011)	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	0.24 (0.020)	0.23 (0.013)	0.18 (0.005)	0.20 (0.012)	n.s.	0.027	n.s.
	<i>Acer</i>	0.19 (0.005)	0.21 (0.007)	0.19 (0.009)	0.23 (0.017)	0.129	n.s.	n.s.
RWR	<i>Alnus</i>	0.26 (0.011)	0.26 (0.007)	0.27 (0.009)	0.25 (0.014)	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	0.44 (0.030)	0.43 (0.021)	0.63 (0.012)	0.60 (0.019)	0.05	<0.0001	n.s.
	<i>Acer</i>	0.49 (0.021)	0.48 (0.013)	0.56 (0.024)	0.51 (0.025)	n.s.	0.052	n.s.
fine RWR/RW	<i>Alnus</i>	67.78 (1.96)	62.37 (1.19)	67.31 (1.35)	64.11 (1.93)	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	35.01 (2.87)	32.85 (1.97)	34.96 (3.24)	31.80 (3.59)	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Acer</i>	36.62 (1.82)	43.00 (2.80)	42.71 (2.96)	48.66 (2.11)	n.s.	0.023	n.s.
T/R	<i>Alnus</i>	2.87 (0.16)	2.90 (0.11)	2.78 (0.14)	2.98 (0.22)	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	1.32 (0.16)	1.36 (0.12)	0.60 (0.030)	0.69 (0.054)	n.s.	<0.0001	n.s.
	<i>Acer</i>	1.06 (0.095)	1.08 (0.063)	0.81 (0.086)	1.00 (0.10)	n.s.	0.095	n.s.

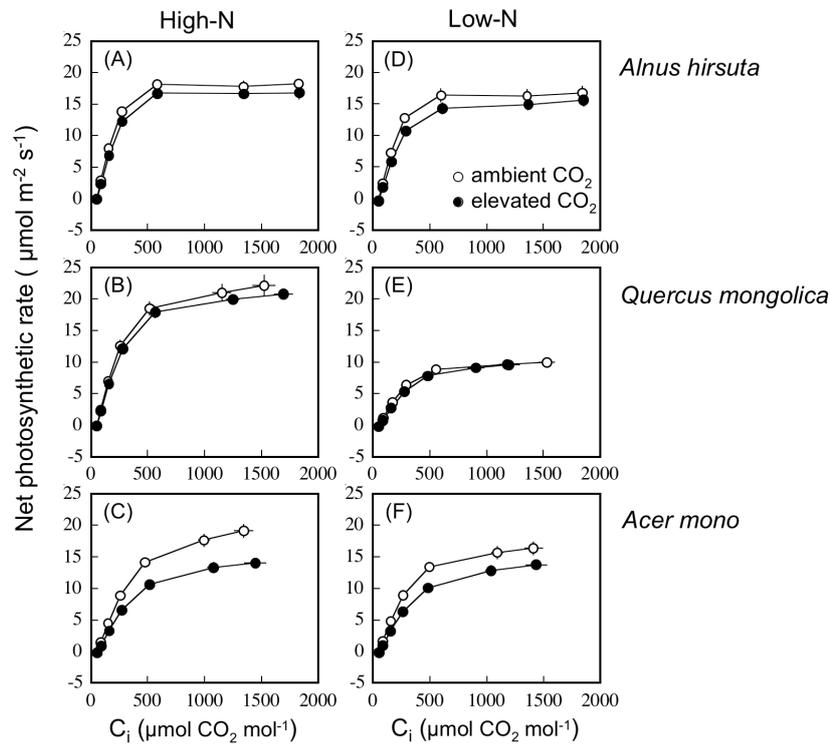


図1. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A, D)、ミズナラ (*Quercus mongolica*) (B, E)、イタヤカエデ (*Acer mono*) (C, F) の成熟葉 (約1ヶ月) の葉内間隙二酸化炭素濃度 (C_i) と光合成速度 (net photosynthetic rate) の関係。High-N (A, B, C) と Low-N (D, E, F) の結果を示す。平均値と標準誤差を示す ($n = 6$)。白丸 通常 CO_2 (ambient CO_2)、黒丸 高 CO_2 (elevated CO_2)

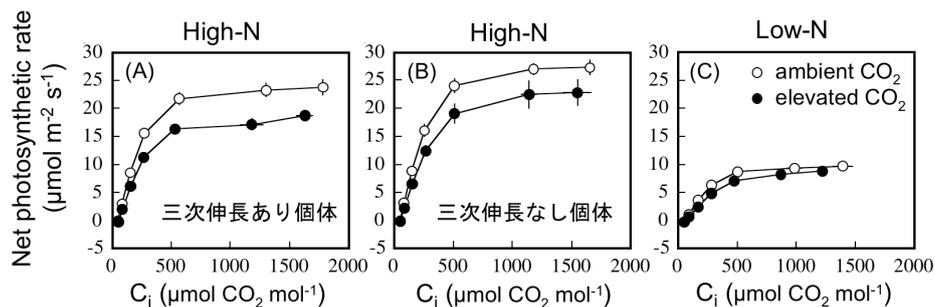


図2. ミズナラの成熟葉 (約1.5ヶ月) の葉内間隙二酸化炭素濃度 (C_i) と光合成速度 (net photosynthetic rate) の関係。High-N (A, B) と Low-N (C) を示す。High-N は三次伸長を示した個体 (A) と三次伸長を示さなかった個体 (B) を分けて示した。平均値と標準誤差を示す ($n = 6$)。白丸 通常 CO_2 (ambient CO_2)、黒丸 高 CO_2 (elevated CO_2)

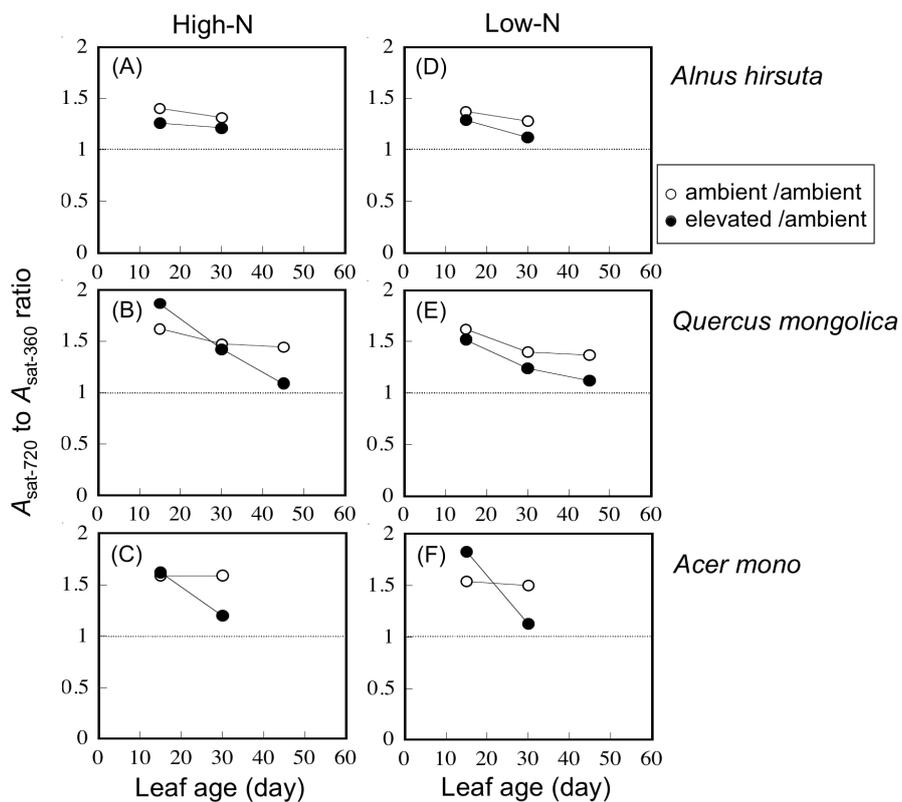


図3. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A, D)、ミズナラ (*Quercus mongolica*) (B, E)、イタヤカエデ (*Acer mono*) (C, F) の葉齢と生育環境の CO₂ 濃度で測定した光飽和光合成速度の比 ($A_{\text{sat-720}}$ to $A_{\text{sat-360}}$ ratio)。黒丸 (高 CO₂ の葉を 720 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ で測定した値) / (通常 CO₂ の葉を 360 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ で測定した値) 白丸 (通常 CO₂ の葉を 720 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ で測定した値) / (通常 CO₂ の葉を 360 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ で測定した値)

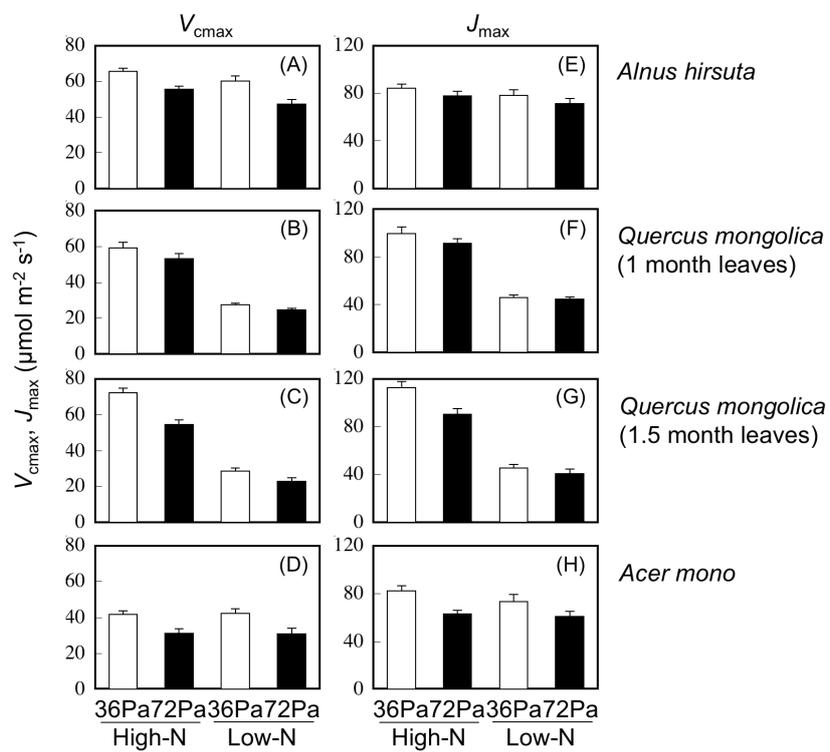


図4. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) 1ヶ月葉 (A, E)、ミズナラ (*Quercus mongolica*) 1ヶ月葉 (B, F)とミズナラ 1.5ヶ月葉 (C, G)、イタヤカエデ (*Acer mono*) 1ヶ月葉 (D, H) の最大炭酸固定速度 (V_{cmax})、最大電子伝達速度 (J_{max})。平均値と標準誤差を示す ($n=6$)。白 通常 CO₂、黒 高 CO₂

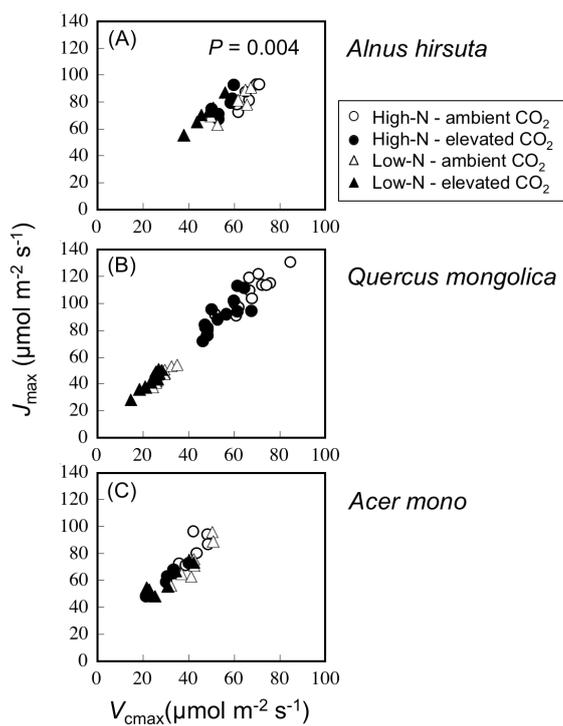


図5. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*; A)、ミズナラ (*Quercus mongolica*; B)、イタヤカエデ (*Acer mono*; C) の最大炭酸固定速度 (V_{cmax}) と最大電子伝達速度 (J_{max}) の関係。図中の P 値は共分散分析 (ANCOVA) の結果を示す。白 通常 CO₂ (ambient CO₂)、黒 高 CO₂ (elevated CO₂)、丸 High-N、三角 Low-N

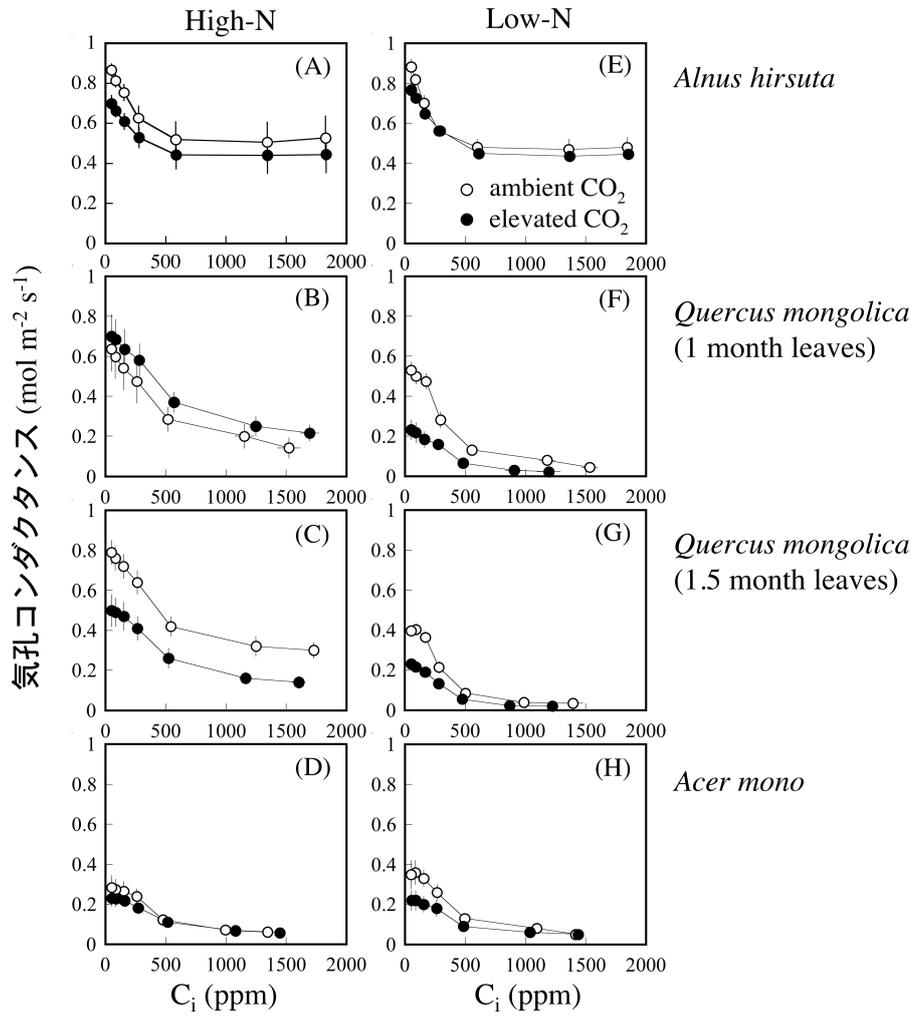


図6. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A, E)、ミズナラ (*Quercus mongolica*) (B, F)、イタヤカエデ (*Acer mono*) (D, H) の成熟葉 (約 1 ヶ月) とミズナラの約 1.5 ヶ月の成熟葉 (C, G) の葉内間隙二酸化炭素濃度 (C_i) と気孔コンダクタンスの関係。High-N (A - D) と Low-N (E - H) を示す。平均値と標準誤差を示す ($n=6$)。白丸 通常 CO_2 (ambient CO_2)、黒丸 高 CO_2 (elevated CO_2)

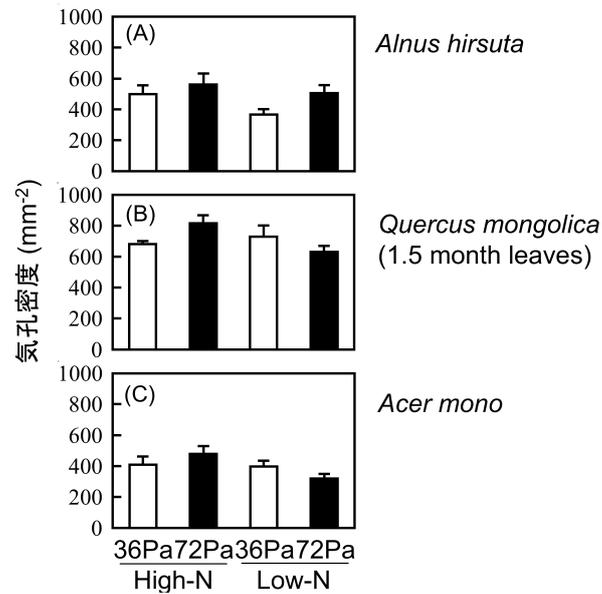


図7. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A, 1ヶ月葉)、ミズナラ (*Quercus mongolica*) (B, 1.5ヶ月葉)、イタヤカエデ (*Acer mono*) (C, 1ヶ月葉) の気孔密度。平均値と標準誤差を示す ($n = 6$)。白丸 通常 CO₂ (ambient CO₂)、黒丸 高 CO₂ (elevated CO₂)

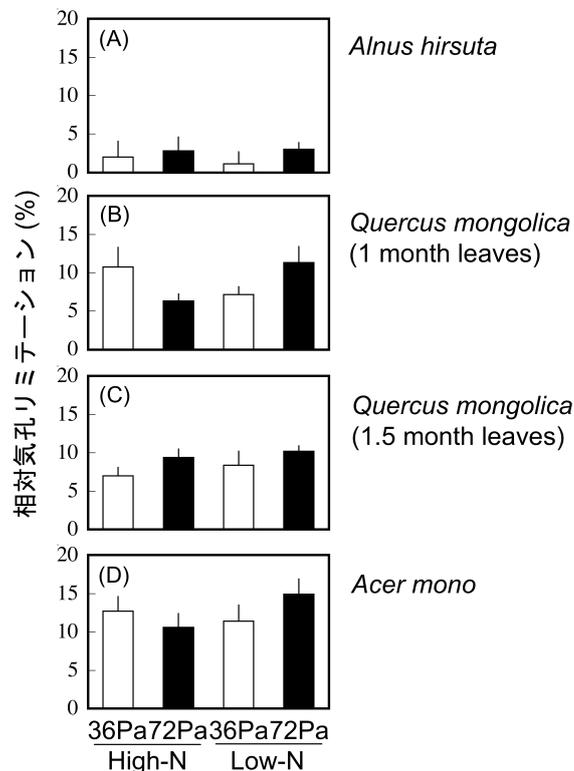


図8. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A)、ミズナラ (*Quercus mongolica*) (B)、イタヤカエデ (*Acer mono*) (D) の成熟葉 (約 1ヶ月) とミズナラの約 1.5ヶ月の成熟葉 (C) の相対気孔リミテーション。平均値と標準誤差を示す ($n = 6$)。白 通常 CO₂、黒 高 CO₂

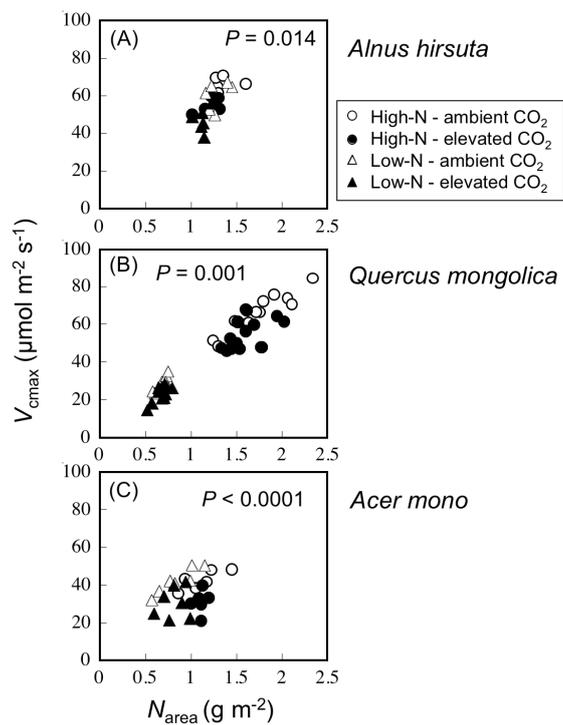


図9. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*; A)、ミズナラ (*Quercus mongolica*; B)、イタヤカエデ (*Acer mono*; C) の単位葉面積あたりの窒素含量 (N_{area}) と最大炭酸固定速度 (V_{cmax}) の関係。図中の P 値は共分散分析 (ANCOVA) の結果を示す。白 通常 CO_2 (ambient CO_2)、黒 高 CO_2 (elevated CO_2)、丸 High-N、三角 Low-N

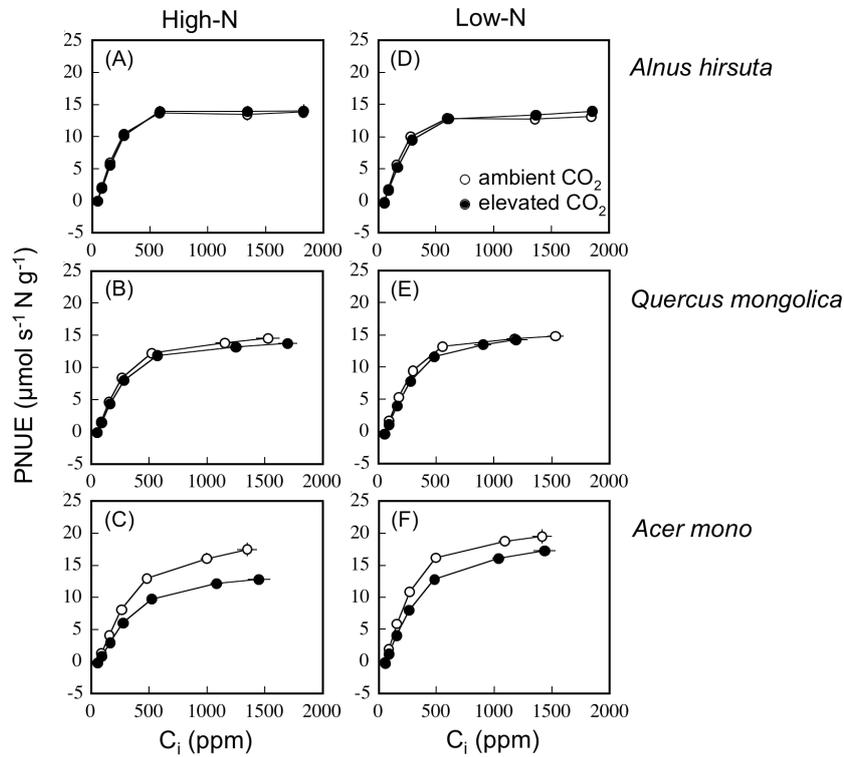


図 10. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A, D)、ミズナラ (*Quercus mongolica*) (B, E)、イタヤカエデ (*Acer mono*) (C, F) の成熟葉 (約 1 ヶ月) の葉内間隙二酸化炭素濃度 (C_i) と光合成窒素利用効率 (PNUE) の関係。High-N (A, B, C) と Low-N (D, E, F) を示す。平均値と標準誤差を示す ($n = 6$)。白丸 通常 CO_2 (ambient CO_2)、黒丸 高 CO_2 (elevated CO_2)

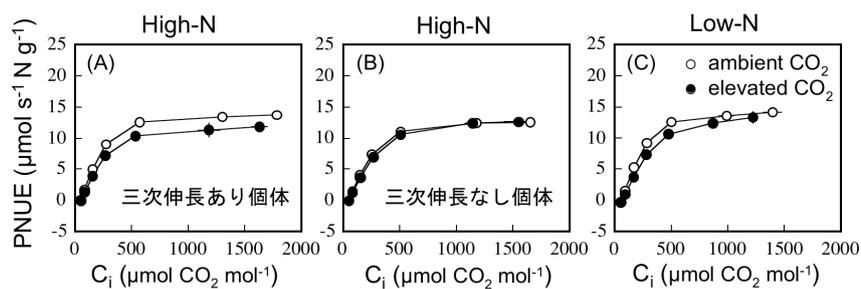


図 11. ミズナラの成熟葉 (約 1.5 ヶ月) の葉内間隙二酸化炭素濃度 (C_i) と光合成窒素利用効率の関係。High-N (A, B) と Low-N (C) を示す。High-N は三次伸長を行った個体 (A) と行わなかった個体 (B) を分けて示した。平均値と標準誤差を示す ($n = 6$)。白丸 通常 CO_2 (ambient CO_2)、黒丸 高 CO_2 (elevated CO_2)

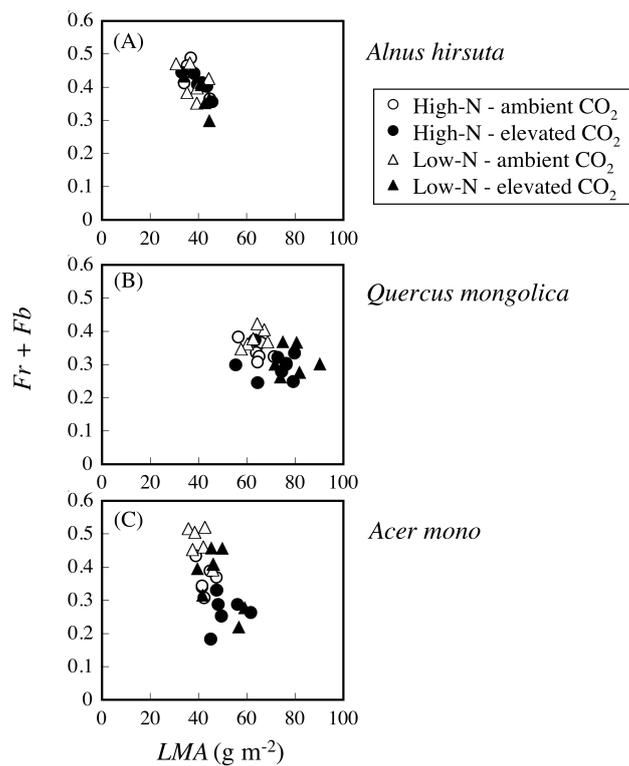


図 12. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*; A)、ミズナラ (*Quercus mongolica*; B)、イタヤカエデ (*Acer mono*; C) の成熟葉の単位葉面積あたりの葉重量 (LMA, g m⁻²) と、ルビスコへの窒素配分比 (F_i) と電子伝達系への窒素配分比 (F_b) の合計値との関係。白 通常 CO₂ (ambient CO₂)、黒 高 CO₂ (elevated CO₂)、丸 High-N、三角 Low-N

3. 3 ケヤマハンノキにおける落葉時の窒素再吸収効率に及ぼす高 CO₂ と窒素供給量の影響—ミズナラ、イタヤカエデとの比較—

3. 3. 1 背景

樹木により吸収された窒素の多くは、落葉として土壌に供給され、微生物による分解を通じて植物が吸収できる形態として供給される。落葉の初期の窒素含量や C / N 比は、落葉の分解速度を左右し、土壌の養分供給量を通じて樹木の成長に影響を及ぼす。大気 CO₂ の上昇は、落葉の質、さらには、その分解速度に影響する可能性がある (Randlett et al. 1996; King et al. 2001; Parsons et al. 2004; Liu et al. 2005; Gill et al. 2006; Kasurinen et al. 2007; Parsons et al. 2008)。生葉の窒素濃度が高 CO₂ で低下することは一致した見解が得られている (Norby 1987; Curtis 1996; Cotrufo et al. 1998; Norby et al. 1999; Norby et al. 2001)。高 CO₂ 下では、生葉の窒素濃度の低下により落葉の窒素濃度も低下し分解速度も遅くなるという概念 (Litter quality hypothesis) が Strain and Bazzaz (1983) により提唱されている。しかし、落葉の窒素濃度に代表される化学性に対する高 CO₂ の影響については、統一的な見解が得られているとはいえない (Arp 1997; Norby et al. 2001; Vizoso et al. 2008)。また、落葉の分解速度に関しても、生葉の窒素濃度の低下を反映して、落葉の窒素濃度の低下や C / N 比の上昇が生じ、高 CO₂ 下で低下すると考えられている (O'Neill and Norby 1996)。しかし、高 CO₂ 下で生育した樹木の落葉の分解速度に関する統一的な見解は得られていない (Vogel et al. 1997)。

老化葉からの窒素再吸収は、樹木の窒素節約において重要な機構であり、落葉の窒素濃度を制御する主要因である (Chapin 1980; Vitousek 1982; Shaver and Chapin 1991; Aerts and Chapin 2000)。そのため、落葉の化学性に対する高 CO₂ の影響を考える場合、窒素再吸収に及ぼす高 CO₂ の影響を考慮する必要がある (Norby et al. 2000)。窒素再吸収効率は、成熟葉の窒素含量に対する、落葉時に再吸収された窒素の割合として表される (Killingbeck 1996)。高 CO₂ 下では、細胞壁などに利用される再吸収されにくい構造的窒素の割合に対して、再吸収されやすい可溶性窒素の割合が低下し、葉内の可溶性窒素と構造的窒素の比 (Pugnaire and Chapin 1993) の変化を通じて窒素再吸収効率が低下する可能性が指摘されている (Arp et al. 1991; Norby et al. 1999, 2001)。その一方で、単位葉重量あたりの窒素再吸収効率が高 CO₂ 下で上昇することが報告されている (Norby et al. 2000; Finzi et al. 2001; Calfapietra et al. 2007)。落葉の窒素再吸収効率に対する高 CO₂ の影響も、まだ統一的な見解を得られ

ていない状況である (Vizoso et al. 2008)。窒素再吸収効率や、葉の老化時に再吸収される窒素の画分には樹種間で大きな差がある (Chapin and Kedrowski 1983) ため、生態系モデルを使った高 CO_2 に対する森林の反応予測のためにはデータの蓄積が必要である。

ケヤマハンノキのような窒素固定樹種は窒素固定能を持たない樹種に比べて通常の CO_2 環境下における窒素の再吸収効率が低く、落葉中の窒素濃度が高い (Killingbeck 1996; Uliassi and Ruess 2002; Tateno et al. 2003)。この点に関して、窒素固定と窒素再吸収の間に進化的なトレード・オフの関係があるという仮説が提唱されている (Killingbeck 1996)。前節 (3. 2 節) で示したように、高 CO_2 に対する生葉の形態的・化学的性質や、光合成反応、成長における反応では、窒素固定能を持たない樹種と異なった効果がケヤマハンノキで見られた。そのため、窒素固定能を持たない樹種の落葉の高 CO_2 に対する反応は、窒素固定能を持つ樹種と異なる可能性がある。また、土壌養分条件は、高 CO_2 に対する光合成の反応だけでなく、養分再吸収にも影響を及ぼす場合があることが示唆されている (Wright and Westby 2003)。そこで、この節では、ケヤマハンノキと、窒素固定能を持たない遷移系列上の位置の異なるミズナラとイタヤカエデ間で、落葉の質 (窒素濃度、C / N 比、LMA) と落葉前の窒素再吸収効率に及ぼす高 CO_2 と土壌の窒素供給量の影響の違いを明らかにすることを目的とした。この節では、窒素固定能を持たない樹種の落葉の性質と落葉前の窒素再吸収効率の高 CO_2 に対する反応はケヤマハンノキと異なるという仮説を立てた。

3. 3. 2 材料と方法

3. 3. 2. 1 落葉時の窒素再吸収効率

材料には、前節 (3. 2) と同じものを用いた。9 月から 11 月にかけて生育温度を、夏期の 26 / 16°C (day/night) から、段階的に 20 / 10°C、20 / 10°C と下げた。各樹木個体の落葉を毎日回収した。一定面積のディスクを抜き、80°C で 48 時間乾燥させた後、単位面積あたりの葉重量 (LMA) を求めた。

重量あたりの窒素含量 (N_{mass}) を NC アナライザー (SUMIGRAPH, NC-800; Sumika Chem. Anal. Service, Osaka, Japan) を用いて分析した。これらの落葉のデータは樹木個体ごとに算出した。処理開始から 100 日後に刈り取った樹木個体の葉の LMA と N_{mass} を測定し、樹木個体あたりの平均値を算出した。葉齢間の LMA と N_{mass} の変動の確認のために、ケヤマハンノキではリーダーシュートの先から 3 番目、6 番目、9 番目の葉を測定した。ミズナラとイタヤカエデは一次伸長と二次伸長の枝別に分けて測定した。ミズナラでは三次伸長を行う個体もあったため区別した。窒素再吸収効率 (RE)

は下記の式を用いて算出した (Enoki and Kawaguchi 1999; Tateno and Kawaguchi 2002; Van Heerwaarden et al. 2003; Wang et al. 2003; Aerts et al. 2007)。

$$N \text{ resorption efficiency } (RE) = 100 (N_g - N_s) / N_g \quad (1)$$

N_g は処理開始から 100 日後に刈り取った各個体の生葉の平均窒素含量、 N_s は落葉の平均窒素含量を表す。本研究では、同じ個体で生葉と落葉のデータを取るができなかったため、各処理の落葉濃度の平均値と、刈り取った各個体の生葉の窒素濃度の比較により再吸収率を算出し、さらに処理ごとの平均値を算出した。落葉の LMA の結果を用いて、窒素再吸収効率を重量あたり (RE_{mass}) と面積あたり (RE_{area}) の両方で計算した。窒素再吸収効率を面積あたりでも評価した理由は、葉の老化時に可溶性の炭水化物や養分の再吸収により葉の重量が減少するためである (Lajtha 1987; Tateno and Kawaguchi 2002; Van Heerwaarden et al. 2003)。葉からの窒素の溶脱は無視できるほど少ないと仮定した (Parker 1983)。

3. 3. 2. 2 統計解析

スプリットプロットデザインの 2-way ANOVA で落葉の性質 (LMA, C/N 比, N_{mass} , N_{area})、窒素再吸収効率 (RE_{mass} , RE_{area}) に及ぼす CO_2 と窒素供給量の影響を解析した (JMP; SAS Institute, 2003; $P < 0.05$)。 $P < 0.15$ を傾向があると解釈した。落葉の性質に及ぼす生葉の性質の影響を考察するために、3. 2 節の結果で示した生葉のパラメータ、 V_{cmax} , J_{max} , F_r , F_b , N_{area} , LMA 間の関係の処理間差を、処理を要因として、共分散分析 (ANCOVA) で解析した。共変量には V_{cmax} や N_{area} や LMA を用いて解析した。必ずしもパラメータ間で有意な相関を示さなかったため、2 つの窒素処理のデータをまとめて解析を行った。まず、処理 (CO_2) と共変量の間交互効果の検定を行った。もしこの交互効果が有意でない場合、交互効果の項を除外して解析を続けた。

3. 3. 3 結果

3. 3. 3. 1 落葉の窒素含量

落葉の LMA は、イタヤカエデ以外では高 CO_2 で増加する傾向を示した (図 1, 表 1)。落葉の重量あたりの窒素含量 (N_{mass}) に対する高 CO_2 の効果はいずれも統計的には有意でなかった。落葉の

LMA と N_{mass} の変化から、ケヤマハンノキでは落葉の N_{area} に高 CO_2 と N 処理の影響が見られず、ミズナラでは高 CO_2 で増加する傾向を示した ($P = 0.141$)。ケヤマハンノキでは、高 CO_2 で落葉の C / N 比が上昇する傾向を示したが ($P = 0.103$)、ミズナラとイタヤカエデでは高 CO_2 で C / N 比が低下する傾向を示した (統計的な有意差なし)。以上の落葉の高 CO_2 に対する反応に、ケヤマハンノキでは窒素供給量の影響はなく、ミズナラとイタヤカエデでは Low-N で落葉の N_{mass} が低下し、C / N 比が上昇した。

3. 3. 3. 2 窒素再吸収効率

落葉時の単位葉面積あたりの窒素再吸収効率 (RE_{area}) は、いずれも高 CO_2 で上昇することはなかった (図 2A, 表 5)。ケヤマハンノキでは、 CO_2 と窒素処理間で交互効果が見られ ($P < 0.0001$)、Low-N の高 CO_2 で RE_{area} の低下が顕著に見られた。ミズナラでも、 CO_2 と窒素処理間の交互効果の傾向がみられたが ($P = 0.063$)、高 CO_2 ($P = 0.010$) と Low-N ($P = 0.035$) のそれぞれで RE_{area} が低下した。イタヤカエデは Low-N で有意に RE_{area} が上昇し ($P = 0.001$)、高 CO_2 では低下する傾向を示した ($P = 0.122$)。単位葉重量あたりの窒素再吸収効率 (RE_{mass}) も RE_{area} と同様の傾向を示したが、絶対量は RE_{area} に比べて低い場合があった (図 2B)。

3. 3. 3. 3 落葉中の窒素含有量

8 月の刈り取り時の樹木個体あたりの葉面積を落葉の葉面積と等しいと仮定し、樹木個体が生産した落葉中に含まれる窒素量を計算した結果、ケヤマハンノキでは窒素処理に関わらず高 CO_2 で落葉中に含まれる窒素量が増加した (表 2)。ミズナラでは CO_2 と窒素処理間で交互効果があり、High-N では高 CO_2 で落葉中に含まれる窒素量が増加したが、Low-N では CO_2 処理間の差がなかった。イタヤカエデもミズナラと同様の反応を示したが、 CO_2 処理の効果はミズナラより不明瞭であった。

3. 3. 4 考察

3. 3. 4. 1 落葉の窒素濃度

高 CO_2 下での樹木の落葉の生産量と化学的性質 (窒素濃度や、C / N 比、リグニン/窒素比など) の変化は、微生物によるリターの分解速度に影響を及ぼし (Strain and Bazzaz 1983; Berg 1986; Taylor et al. 1989; Aber 1990; Berg et al. 1996; Cotrufo and Ineson 1996; Hasegawa and Takeda 1996; O'Neill and Norby

1996; Randlett et al. 1996; Enoki and Kawaguchi 2000; King et al. 2001; Osono and Takeda 2004; Parsons et al. 2004; Liu et al. 2005; Parsons et al. 2008)、樹木が吸収するための窒素供給量を変化させる可能性がある (Zak et al. 2003; Chapman et al. 2005; Gill et al. 2006; Calfapietra et al. 2007)。高CO₂ 下で落葉の窒素濃度が低下するという報告が多く見られる (Liu et al. 2005; Liu et al. 2007; Parsons et al. 2008; Liu et al. 2009)。本研究では、落葉の窒素濃度 (N_{mass}) に対する高CO₂ の効果は統計的には有意ではなかったが、ケヤマハンノキの落葉の N_{mass} は高CO₂ 下で低下傾向を示したのに対し、ミズナラとイタヤカエデでは、逆に高CO₂ 下で落葉の N_{mass} が増加する傾向を示した (図1, 表1)。今回の結果は、高CO₂ 下で落葉の窒素濃度が低下しない、もしくは影響が少ないという報告 (Hall et al. 2005) を支持する結果であった。*Quercus rubra* の落葉でも窒素濃度に対する高CO₂の影響が少ないかほとんどないことが報告されている (Vizoso et al. 2008)。生葉の N_{mass} は高CO₂ 下で低下する傾向を示したが、落葉の N_{mass} では高CO₂ の効果が明瞭でなかった理由はなぜだろうか？

3. 3. 4. 2 窒素再吸収効率

養分の再吸収効率は樹種間で大きな差がある (Chapin and Kedrowski 1983)。高CO₂ に対する反応でも、窒素再吸収効率が低下した例 (Arp 1991)、上昇した例 (Norby et al. 2000; Finzi et al. 2001; Calfapietra et al. 2007) が報告されている。また、高CO₂ 下で窒素再吸収率が変化しないことがコナラ属の *Quercus rubra* で報告されている (Vizoso et al. 2008)。報告例の多くは単位葉重量あたりで算出した窒素再吸収効率の結果である。落葉時には葉の重量減少 (mass resorption) が生じ、LMA が低下するため、単位葉面積あたりの窒素再吸収効率の評価が望ましいと考えられている (Nordell and Karlsson 1995; van Heerwaarden et al. 2003; Tateno et al. 2004)。本研究では葉重量あたりと葉面積あたりの両方で窒素再吸収効率の評価を行ったが、落葉時の窒素再吸収効率は、ケヤマハンノキのHigh-N を除いて高CO₂ で低下する傾向を示した (図2, 表1)。落葉時の窒素再吸収効率が高CO₂ 下で低下したために、生葉の N_{mass} が高CO₂ 下で低下傾向を示したにも関わらず、落葉の N_{mass} に対する高CO₂ の効果が不明瞭になったと考えられる。ではなぜ高CO₂ 下で窒素再吸収効率が低下したのだろうか？

3. 3. 4. 3 LMA と葉内窒素配分

葉内の窒素は、構造的なタンパク質と代謝系タンパク質に配分されており (Charles-Edwards 1987; Yasumura et al. 2006)、構造的窒素と可溶性 (代謝系) 窒素の比は窒素再吸収効率を制御する重要な要因の一つと考えられている (Pugnaire and Chapin 1993)。高 CO₂ 環境下では、葉内の構造的窒素量と

可溶性窒素量の変化や、両者の比の変化が生じ、窒素再吸収効率に影響を及ぼす可能性がある (Arp et al. 1991; Norby et al. 1999)。

構造的なタンパク質に配分された窒素は細胞壁などに利用され再吸収されにくい (Field 1983; Charles-Edwards 1987; Anten and Werger 1996; O'Neil and Norby 1996; Vogel et al. 1997; Hikosaka 2003; Yasumura et al. 2006)。LMA は、細胞壁の厚さ (Niinemets 1997) や細胞壁の物質質量 (Onoda 20004; Takashima et al. 2004) だけでなく、構造的タンパク質への葉内窒素の配分量とも相関がある (Yasumura et al. 2006)。高 CO₂ 下では成熟葉の LMA が増加する傾向にあり (Long et al. 2004)、本研究でも高 CO₂ で成熟葉の LMA が増加傾向を示した (3. 2 節, 表 3)。ミズナラとイタヤカエデのほうが高 CO₂ による生葉の LMA の変化幅がケヤマハンノキよりも大きかったことから、高 CO₂ 下で構造的タンパク質への窒素の配分の増加も大きい可能性が推察される。

代謝系タンパク質に配分された窒素は光合成に関連する酵素が多く (Evans 1989; Evans and Seemann 1989)、分解されやすく葉の老化時に再吸収されやすい (Field 1983; Mae 2004; Yasumura et al. 2006)。植物のタンパク質の中で最も多いのは光合成系の酵素であるルビスコであり、C₃ 植物の葉の全タンパク質の 15 - 30% を占める (Evans 1989; Evans and Seemann 1989)。高 CO₂ 下で光合成のダウンレギュレーションが生じ、ルビスコ量もしくはルビスコの活性を表す V_{cmax} が低下する場合が多い (Moore et al. 1999; Long et al. 2004; Ainsworth and Long 2005; Roger and Ainthworth 2006)。ケヤマハンノキは高 CO₂ で V_{cmax} のみ低下したが、ミズナラとイタヤカエデは V_{cmax} と電子伝達系 (bioenergetics) へ配分される窒素量と関連のある J_{max} の両方が低下した (3. 2 節, 図 4)。Niinemets and Tenhunen (1997) の式から算出したルビスコと電子伝達系への窒素画分の配分比 (F_r , F_b) は、ケヤマハンノキでは CO₂ 処理間で差がなかったが、ミズナラとイタヤカエデでは高 CO₂ で低下する傾向を示した (3. 2 節, 表 4)。さらに、ミズナラとイタヤカエデは同じ CO₂ 濃度で測定した場合の、葉の単位窒素量あたりの光合成速度 (光合成における窒素利用効率; PNUE) が高 CO₂ 下で低下した (3. 2 節, 図 10, 11)。PNUE は、葉の窒素中の構造要素や非光合成系、集光系要素への配分が高い樹種で、比較的低いことが示唆されている (Hikosaka 2004)。SPAD 値が高 CO₂ で上昇することはなかった (イタヤカエデでは逆に高 CO₂ で低下した) ため (3. 2 節, 表 3)、ケヤマハンノキ以外の 2 種では光合成機能以外への窒素配分の増加により PUNE が低下したことが示唆された。以上の結果から、高 CO₂ 下での代謝系タンパク質への窒素の配分は、ケヤマハンノキよりもミズナラとイタヤカエデのほうが減少した可能性が示唆される。

窒素配分比の合計 ($F_r + F_b$) を可溶性 (代謝系) 窒素量の指標とし、LMA を構造的窒素量の指標

として、両者の関係を見ると (3. 2 節, 図 12)、高 CO₂ での LMA の増加の程度は、遷移初期種のケヤマハンノキ < 遷移中期種のみズナラと後期種のイタヤカエデであり、($F_r + F_b$) の低下の程度は、ケヤマハンノキで少なく、みズナラ・イタヤカエデで多いという傾向を示した。このような葉内の窒素配分の樹種間差が、成熟葉の高 CO₂ に対する光合成反応だけでなく (3. 2 節)、高 CO₂ 下での窒素再吸収効率の変化にも影響を及ぼした可能性が推察された。

3. 3. 4. 4 落葉による土壌への窒素供給量

樹木個体の成長量は、High-N ではイタヤカエデ以外の 2 樹種で高 CO₂ により促進され、Low-N ではケヤマハンノキのみ高 CO₂ により促進された (3. 2 節, 表 6)。同じ樹木個体重量で比較した場合、高 CO₂ で LAR が低下する傾向を示したが、ケヤマハンノキの High-N と Low-N とみズナラの High-N では高 CO₂ で成長量が促進され、樹木個体あたりの葉面積は高 CO₂ で通常 CO₂ より増加した (表 2)。落葉の N_{area} は高 CO₂ で低下しなかったため (図 1)、高 CO₂ 下で成長量が増加した場合は落葉による土壌への窒素供給量は増加することが明らかになった (表 2)。高 CO₂ 下で落葉中の窒素含量が減少し、落葉による土壌への窒素供給量が減少したというヤマナラシ属 (*Populus*) の報告例もあり (Calfapietra et al. 2007)、高 CO₂ 下での落葉を通じての窒素供給量は、樹種や生育条件に依存して変化することが示唆された。ケヤマハンノキは、他の 2 樹種と異なり窒素不足の立地でも高 CO₂ 下で成長量が増加し、落葉による土壌への窒素供給が増えることから、今回の実験のように窒素以外の養分や水分が制限されていない場合、高 CO₂ 下で窒素固定の増加による窒素不足の土壌への窒素供給量の増加が期待できると考えられる。

ただし、高 CO₂ 下では落葉の化学的性質の変化により分解速度が低下することや、樹種間で高 CO₂ に対する落葉の性質の反応が異なることが示唆されている (Randlett et al. 1996; King et al. 2001; Parsons et al. 2004; Liu et al. 2005; Parsons et al. 2008)。高 CO₂ に対してケヤマハンノキの落葉の C / N 比は High-N で 14.4%、Low-N で 8.1% 上昇した (図 1)。同じハンノキ属の *Alnus glutinosa* では、高 CO₂ 下で落葉の C / N 比が 8% 上昇したが、落葉の分解速度にはほとんど影響しなかったと報告されている (Vogel et al. 1997)。本研究のケヤマハンノキでも土壌の窒素供給量の違いに関わらず高 CO₂ 下での落葉の C / N 比の上昇幅が 8% から 14% と比較的小さく、高 CO₂ 下での C / N 比の値も約 33 と低かった。また、みズナラとイタヤカエデの落葉では、ケヤマハンノキと異なり高 CO₂ 下で C / N 比の上昇を示さなかった (図 1, 表 1)。これらの C / N 比の結果からは、高 CO₂ による葉リターの分解速度への影響は少ない可能性が推察された。

落葉の分解速度にはリグニン／窒素比や縮合タンニン濃度なども影響する (Parsons et al. 2008)。高 CO₂ 下では縮合タンニンや総フェノール量など二次代謝物質の濃度が増加する場合がある (Kasurinen et al. 2007)。Koike et al. (2006) は今回対象とした 3 樹種間で成熟葉中の被食防衛物質 (縮合タンニンと総フェノール) の高 CO₂ 応答に違いがあることを示した。成熟葉の性質を反映して、落葉でも樹種間や樹種内の生育環境の違いにより二次代謝産物の濃度や窒素との相対比が異なる可能性が考えられるため、高 CO₂ に対する落葉の分解速度の反応の予測のためにはさらにデータの蓄積が必要と考える。

3. 3. 4. 5 窒素再吸収効率の評価手法

窒素再吸収効率の評価については、実験設定やサンプリング方法の影響が指摘されている (O'Neil and Norby 1996)。メタアナリシスの研究例では、落葉の窒素濃度が高 CO₂ 下で 7.1% 低下したが、低下を示したのはポットやチャンバーを使った結果のみで、野外の自然状態では低下がなかったことから、落葉の窒素濃度の低下に人為的な影響が指摘されている (Norby et al. 2001)。落葉の窒素濃度には、樹木の生育する養分条件や光環境などの実験設定、使用した落葉の状態 (O'Neill and Norby 1996)、葉の老化過程に関わる要因 (Arp et al. 1991; Norby et al. 2000) などが影響すると考えられる。本研究ではファイトトロンを用い、成熟葉と落葉を採取する位置を同一個体内に固定しなかったため、落葉の窒素濃度や落葉時の窒素再吸収効率の評価に人為的な影響があることは否定できない。Killingbech (1996) は落葉の窒素濃度 1% を再吸収が不完全かどうかの指標とした。また、Norby et al. (2001) は落葉の窒素濃度が 1% を超えているときに高 CO₂ の影響が大きい事を示した。本研究では、ケヤマハンノキとイタヤカエデでは、リターの平均窒素濃度が 1% (10 mg g⁻¹) より高い場合があったため (図 1)、窒素の再吸収が不完全であった可能性も否定できない。ただし、高 CO₂ では LMA の上昇や窒素濃度の低下などの成熟葉の性質の変化があるため (3. 2 節, 表 3)、落葉時の窒素再吸収の基準が通常 CO₂ 時の 1% とは異なる可能性も考えられる。Norby et al. (2001) が述べているように、チャンバー実験だからといって必ずしも処理に対する各樹木の相対的な反応が認められない訳ではない。しかし、実験で得られた結果を野外条件で生育する樹木の反応へ還元できるかどうか判断することは難しいということは認識しなければならない。一方、本研究の特徴としては、落葉時の重量減少を考慮し、単位葉面積あたりの窒素再吸収効率を評価している点があげられる。窒素再吸収効率の高 CO₂ 応答に関してはまだ統一の見解が得られておらず、今回の実験結果も高 CO₂ 下での物質循環を考える上で一つの有益な情報となると考える。

3. 3. 4. 6 まとめ

第3章の結果を、ケヤマハンノキの反応に焦点を当ててまとめる。ケヤマハンノキは高 CO₂ 下で生育した場合、他の窒素固定能を持たない樹種（今回の実験では、ミズナラとイタヤカエデ）に比べて、光合成能力の低下が少なく、通常大気 CO₂ 条件下で生育する個体より高い光合成速度を維持した。葉重量や葉面積など、バイオマス配分に対する CO₂ の影響は顕著でなかったため、高 CO₂ に対する光合成反応を反映して、個体の成長量が増加した。個体の成長量増加に伴い個体あたりの根粒形成量も増加した。その結果、高 CO₂ で単位根粒重量あたりの活性は上昇しなかったものの、個体あたりの窒素固定量が増加する傾向を示した。窒素固定により樹体内に吸収された窒素は、主に落葉を通じて土壌に供給される。ケヤマハンノキの成熟葉の窒素濃度は高 CO₂ 下で低下したが、落葉時の窒素再吸収効率が高 CO₂ 下で低下する傾向を示した。落葉の N_{area} は高 CO₂ で低下せず、高 CO₂ 下での成長量の増加に伴い樹木個体あたりの葉面積が増加したため、落葉中に含まれる窒素含量が高 CO₂ 下で増加した。つまり、高 CO₂ 下で樹木個体あたりの窒素固定量が増加したことを反映して、落葉を通じて土壌に供給される窒素量も高 CO₂ 下で増加することが示唆された。以上の結果は、窒素供給量が不足する場合でも同様に見られた。ポット苗を用いた実験結果であるが、窒素不足の立地においても、高 CO₂ 下でケヤマハンノキの成長が促進され、窒素固定量の増加により落葉を通じての土壌への窒素供給量が増加し、他樹種の高 CO₂ に対する成長反応を促進させる役割を担うことが期待されることが示唆された。

ただし、高 CO₂ 下で落葉の C / N 比が上昇傾向を示したことから、落葉の分解速度が通常大気に比べて遅くなる可能性も考えられた。分解速度に関しては未解明のまま残った。他の報告でも、多くの樹種に関して、落葉の分解速度が遅くなる場合や速くなる場合、変わらない場合と様々な結果が示されている状況であり、野外の森林生態系での CO₂ 付加実験 (FACE) 研究によるデータの蓄積が望まれる。なお、通常大気 CO₂ の場合と同様に、土壌の窒素供給量が多い場合に根粒形成が抑制されることが明らかになった。この結果から、高 CO₂ で、ケヤマハンノキの窒素固定を通じた土壌への窒素供給が、通常大気 CO₂ のときより長期間続くわけではないことが示唆された。

表 1 3 樹種の落葉の性質と窒素再吸収効率。ケヤマハンノキ (*Alnus*)、ミズナラ (*Quercus*)、イタヤカエデ (*Acer*) の各処理における単位葉面積あたりの葉重量 (LMA, g m^{-2})、単位葉重量あたりの窒素含量 (mass based leaf N; N_{mass} , mg g^{-1})、単位葉面積あたりの窒素含量 (area based leaf N; N_{area} , g m^{-2})、C/N 比 (C/N ratio)、単位葉面積あたりの窒素再吸収効率 (area based RE; RE_{area} , %)、単位葉重量あたりの窒素再吸収効率 (mass based RE; RE_{mass} , %)。CO₂ 処理 (ambient; 通常 CO₂, elevated; 高 CO₂) と N 処理 (High-N, Low-N) に対して行った分散分析の結果 (*P* 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)

		Source of variance		
		CO ₂	N	CO ₂ x N
LMA (g m^{-2})	<i>Alnus</i>	0.065	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	0.058	n.s.	n.s.
	<i>Acer</i>	n.s.	0.113	n.s.
mass based leaf N (mg g^{-1})	<i>Alnus</i>	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	n.s.	<0.0001	n.s.
	<i>Acer</i>	n.s.	<0.0001	n.s.
area based leaf N (g m^{-2})	<i>Alnus</i>	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	0.141	0.0009	n.s.
	<i>Acer</i>	n.s.	0.0001	n.s.
C/N ratio	<i>Alnus</i>	0.103	n.s.	n.s.
	<i>Quercus</i>	n.s.	<0.0001	n.s.
	<i>Acer</i>	n.s.	<0.0001	n.s.
area based RE (%)	<i>Alnus</i>	0.047	<0.0001	<0.0001
	<i>Quercus</i>	0.010	0.035	0.063
	<i>Acer</i>	0.124	0.001	n.s.
mass based RE (%)	<i>Alnus</i>	n.s.	0.011	n.s.
	<i>Quercus</i>	0.040	<0.0001	n.s.
	<i>Acer</i>	0.018	<0.0001	0.006

表2 ケヤマハンノキ (*Alnus*)、ミズナラ (*Quercus*)、イタヤカエデ (*Acer*) の個体あたりの総葉面積 (total LA, m²) と落葉中に含まれる総窒素含量 (total N in leaf litter, mg)。各処理区の平均値 (標準誤差) を示す ($n = 6$)。CO₂ 処理 (ambient; 通常 CO₂, elevated; 高 CO₂) と N 処理 (High-N, Low-N) に対して行った分散分析の結果 (P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)

		High-N		Low-N		Source of variance		
		ambient	elevated	ambient	elevated	CO ₂	N	CO ₂ x N
total LA	<i>Alnus</i>	0.37 (0.032)	0.42 (0.035)	0.34 (0.023)	0.40 (0.032)	0.017	n.s.	n.s.
	(m ²) <i>Quercus</i>	0.14 (0.013)	0.18 (0.012)	0.073 (0.010)	0.061 (0.010)	0.010	<0.0001	0.024
	<i>Acer</i>	0.027 (0.002)	0.031 (0.003)	0.028 (0.002)	0.025 (0.003)	n.s.	n.s.	n.s.
total N in leaf litter	<i>Alnus</i>	245.5 (21.1)	254.3 (21.1)	241.3 (16.4)	300.6 (24.0)	0.022	n.s.	n.s.
	(mg) <i>Quercus</i>	43.9 (4.3)	97.7 (6.2)	15.2 (2.2)	16.3 (2.6)	0.004	<0.0001	<0.0001
	<i>Acer</i>	18.1 (1.3)	26.9 (2.8)	9.2 (0.8)	10.8 (1.3)	n.s.	<0.0001	0.074

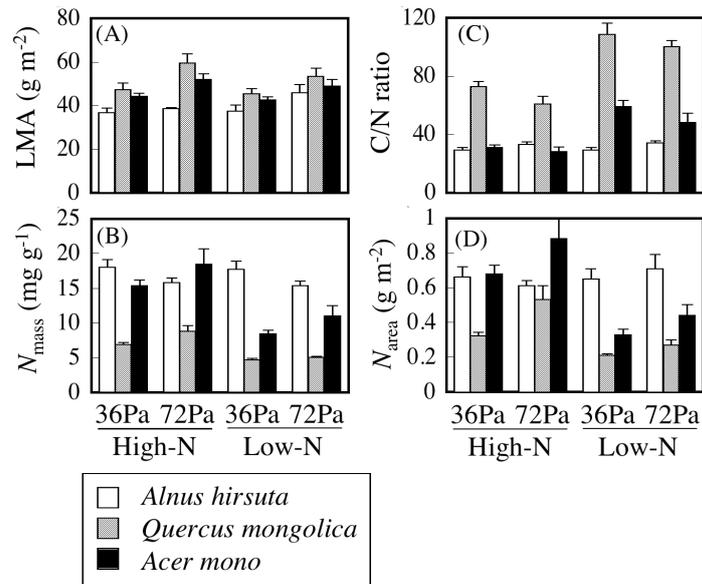


図 1. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*)、ミズナラ (*Quercus mongolica*)、イタヤカエデ (*Acer mono*) の落葉の各処理における単位葉面積あたりの葉重量 (LMA, g m^{-2} ; A)、単位葉重量あたりの窒素含量 (N_{mass} , mg g^{-1} ; B)、C/N 比 (C/N ratio, C)、単位葉面積あたりの窒素含量 (N_{area} , g m^{-2} ; D)。平均値と標準誤差で示す ($n=6$)。36Pa は通常 CO_2 、72Pa は高 CO_2 を表す

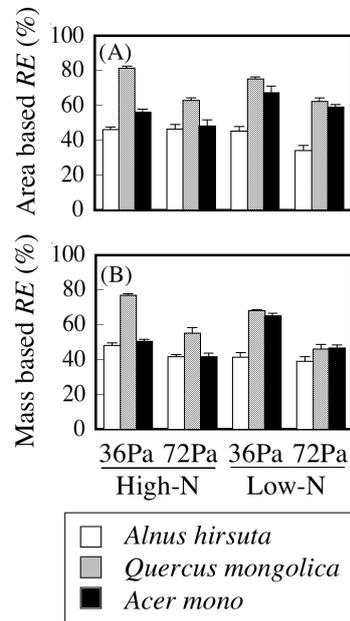


図 2. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*)、ミズナラ (*Quercus mongolica*)、イタヤカエデ (*Acer mono*) の落葉時の窒素再吸収効率。単位葉面積あたりの窒素再吸収効率 (area based RE; RE_{area} , %; A)、単位葉重量あたりの窒素再吸収効率 (mass based RE; RE_{mass} , %; B)。平均値と標準誤差で示す ($n=6$)。36Pa は通常 CO_2 、72Pa は高 CO_2 を表す

第4章

ケヤマハンノキの成長、根粒形成、光合成特性に及ぼす高 CO₂ とリン酸供給量と土壤乾燥の影響ーミヤマハンノキとの比較ー

第4章では、第3章に引き続き、ケヤマハンノキのポット苗を用いて環境調節実験施設において行った二つ目の実験結果を示す。第3章で、土壤の窒素供給量が多い場合に、高 CO₂ 環境下でも根粒形成が抑制されることが明らかになった。そこで第4章では、土壤中の窒素供給量が少なく、根粒形成の抑制が生じにくい場合を想定して、土壤中のリン酸供給量と土壤水分条件の違いがケヤマハンノキの根粒形成や、光合成、成長の高 CO₂ 応答に及ぼす影響について結果を示す。

4. 1 背景

高 CO₂ 環境下で樹木が高い成長速度を維持するためには、森林生態系の外部からの追加的な窒素供給が必要だろうと考えられており (Johnson 2006; Reich et al. 2006)、共生的窒素固定は将来の高 CO₂ 環境下における窒素供給として重要視されている (Houghton et al. 2001)。ハンノキ属樹種のような窒素固定樹種は、土壤窒素に対する依存度が低いため、窒素固定能力を持たない植物に比べて高 CO₂ に対して、光合成能力や成長速度の上昇のような積極的な反応を示すことが予想される (Norby 1987; Amon and Gordon 1990; Vogel et al. 1997; Temperton et al. 2003)。しかし、ハンノキ属樹種の窒素固定能力はさまざまな環境要因に影響を受ける (Hungate et al. 2003; Dawson 2008)。

今後、大気からの窒素沈着量の増加に伴い (Vitousek et al. 1997; Hyvönen et al. 2007; Wallace et al. 2007)、土壤中の養分バランスが崩れ、土壤中のリン酸供給量が制限される可能性がある (Gress et al. 2007)。リゾビウムと共生し窒素固定能を持つマメ科植物と同様、フランキアと共生するアクチノリザル植物も成長と根粒形成、窒素固定のためにリン酸を必要とする (Huss-Danell 1997; Valverde et al. 2002)。そのためリン酸供給量の不足は、現状の CO₂ 条件下でも窒素固定樹種の根粒形成や窒素固定能力を抑制する (Gentili and Huss-Danell 2003; Edwards et al. 2006)。高 CO₂ 環境下では、樹木のリン酸

要求度が増加するという研究例があり (Kogawara et al. 2006; Lewis et al. 2010)、リン酸要求度の高い窒素固定樹種では他の窒素固定能を持たない樹種に比べて高 CO₂ 下でリン酸不足の状態になりやすい可能性がある。

将来、気温上昇により夏期の降雨量が減少する可能性が予測されている (Naumburg et al. 2004; Geßler et al. 2007)。根粒のニトロゲナーゼ活性は、光、温度、無機養分、土壌 pH などと同様、土壌水分にも影響を受け、乾燥ストレスにより低下する (Sundström and Huss-Danell 1987; Huss-Danell 1990; Hawkins and McDonald 1994; Uliassi and Rogers 2002; Pawlowski and Newton 2008; Sharma et al. 2010)。降雨量の減少に伴う土壌乾燥は、気孔閉鎖により光合成速度を低下させ (Flexas and Medrano 2002)、植物の成長を抑制する。根粒での窒素固定にはエネルギー源として宿主植物からの光合成生産物の供給が必要であるため、土壌乾燥に対する光合成の順化反応は根粒形成や窒素固定能力に影響することが考えられる。一方で、土壌乾燥ストレスに対する光合成の順化反応として、最大炭酸固定速度 (V_{cmax}) が上昇するという研究例がある (Kitao et al. 2003; Qaderi et al. 2006; Kitao et al. 2007)。この乾燥に対する光合成の順化反応は、多くの植物が高 CO₂ 下で示す光合成能力の低下 (光合成のダウンレギュレーション) の反応 (Long et al. 2004; Nowak et al. 2004; Ainsworth and Rogers 2007) と逆向きの反応となる。そのため、高 CO₂ の光合成による負の効果が緩やかな乾燥条件により緩和される可能性が示唆されている (Qaderi et al. 2006; Kitao et al. 2007)。

この章では、ケヤマハンノキの根粒形成、光合成反応、成長に及ぼす、高 CO₂ と土壌リン酸供給量不足と土壌乾燥の相互効果を明らかにすることを目的とした。以下の 2 点を仮説とした。1. リン酸供給量不足により高 CO₂ に対する光合成、成長反応が抑制される。2. 土壌乾燥に対する光合成の順化反応が生じ、乾燥土壌条件でも高 CO₂ による光合成速度と成長量の促進効果が生じる。ただし、この土壌乾燥に対する反応は、土壌リン酸供給量不足条件では生じない。日本に分布するハンノキ属樹種は、ケヤマハンノキが属すハンノキ亜属 (*Gymnothyrsus*) とミヤマハンノキ亜属 (*Alnuster*) の 2 亜属に分類される (Somego 1985)。この章の実験では、ハンノキ属樹種の亜属間の高 CO₂ 応答の比較も試みた。

4. 2 材料と実験設定

4. 2. 1 対象樹種

ケヤマハンノキとミヤマハンノキ 1 年生苗 (王子木材緑化、栗山産) を、5 リットル (直径 21 cm) の

プラスチック製ポットに移植した。ミヤマハンノキはミヤマハンノキ亜属 (*Alnaster*) に属す低木種で (Somego 1985)、ケヤマハンノキに比べてより標高の高い場所に分布する。ミヤマハンノキの開葉様式は、ケヤマハンノキと異なり、異形葉型 (一斉+順次型) を示し、短枝も形成する (Kikuzawa 1983)。土壌には、鹿沼土と赤玉土を体積で 1 対 1 の割合で混合した土を用いた。各ポットは養分が抜けないように個別にトレーに乗せた。実験開始時の両種の苗の高さは 14 cm から 18 cm であった。両種とも移植時に苗の根系に根粒の形成を確認した。

4. 2. 2 高 CO₂、土壌リン酸供給量、土壌乾燥処理

苗は、第 3 章の実験と同様、札幌市森林総合研究所北海道支所 (43°N, 141°E; 180 m a.s.l.) において、CO₂ 濃度制御装置 (DAIWA Air Co. Ltd., Sapporo, Japan) を備えた自然光型のファイトトン内 (Koito Industries, Yokohama, Japan) で生育させた。CO₂ 濃度を 360 μmol CO₂ mol⁻¹ (通常 CO₂ 処理, 36 Pa) と 100 年後に現実となる可能性がある 720 μmol CO₂ mol⁻¹ (高 CO₂ 処理, 72 Pa) に設定し、5 月中旬に処理を開始した。各 CO₂ 濃度処理ごとに 3 つのチャンバーを用いた。各樹種 24 個体をそれぞれのチャンバーで育てた。その中の 12 個体に対して、リン酸 (P) 供給量を 7.74 mgP pot⁻¹ week⁻¹ (High-P) とし、残りの 12 個体には、その 10 分の 1 の 0.774 mgP pot⁻¹ week⁻¹ (Low-P) に設定した。肥料は 1/2 Hoagland 液を元に、少し改変を加えて調合した (Asher and Edwards 1983; 0.3 mM KNO₃, 0.2 mM Ca(NO₃)₂/4 H₂O, 0.05 mM NH₄H₂PO₄, 2.25 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.45 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄/7 H₂O, 25 μM EDTA-Fe, 4.5 μM MnCl₂/4 H₂O, 23 μM H₃BO₃, 0.4 μM ZnSO₄/7 H₂O, 0.15 μM CuSO₄/5 H₂O, 0.007 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄/4 H₂O)。4 回に 1 回は塩類集積を避けるために水のみ与えた。リン酸施肥量は、High-P で 2.24 kg ha⁻¹ week⁻¹、Low-P で 0.224 g m⁻² week⁻¹ に相当する。9 月までに 31.32 kg ha⁻¹ のリンを与えることになる (High-P)。他の養分は等量与えた。土壌中の窒素供給量の多さによる根粒形成の抑制を回避するため、窒素施肥は通常の液肥の 10 分の 1 にした (5.25 mgN pot⁻¹ week⁻¹)。この施肥量は、第 3 章の実験における Low-N の施肥量に相当する。Low-P では、K⁺ と Ca²⁺ の濃度を High-P と等しくするために KCl、CaCl₂、KH₂PO₄ を加えた。それぞれのリン酸処理内の 6 個体に対して、1 回あたり 250 ml pot⁻¹ の灌水を週 3 回行い (湿潤処理: Wet)、他の 6 個体に対して週 1 回 (乾燥処理: Dry) 行った。Dry の灌水は液肥として与えた。この量は実験を行った場所の年降水量 957 mm をもとにポットの面積 ($r = 0.105$ m, 0.0346 m²) あたり 1 日あたりの平均量から算出した値 (92 ml pot⁻¹) を考慮して決めた。気温は、26 / 16°C (日中/夜間) に維持した。灌水の前後に夜明け前の葉の水ポテンシャルをプレッシャーチャンバー (Model 3000, Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA) を用い

て測定し、苗木の水分状態を確認した。土壌の体積含水率を Hydrosense (CAMPBELL SCIENTIFIC, Inc. United States) で測定した。これらの苗を各処理環境下で 2 成長期間生育させた。処理 2 年目には、樹木個体サイズの増加に伴い、リン酸施肥量と灌水量を 1 年目の 1.5 倍に増やした。1 年目の生育期間終了後の秋にチャンバー内の温度を徐々に下げ (20 / 16°C, 20 / 10°C, 16 / 10°C)、落葉させた後に、野外の倉庫内で冬期を過ごさせた。翌春の開芽前からポット植栽苗をチャンバー内に移動させ処理を再開した。初期の気温は 16 / 10°C とし、徐々に通常の設定温度である 26 / 16°C に上げた。

4. 2. 3 根粒のニトロゲナーゼ活性

2 生育期間目の 8 月に、アセチレン還元法を用いて各処理 6 個体ずつの根粒のニトロゲナーゼ活性を測定した (Hardy et al. 1973)。測定前に根を洗浄したのち、根が乾燥しないように湿らした状態でそれぞれのチャンバー内に安置した。6 個体洗浄終了後、順次、根を 2 cm 以上残した状態で根粒を採取し測定に用いた。操作を最小限にし、根粒の活性の低下を避ける必要があるため (Huss-Danell 1978; Wheeler 1978)、還元活性の測定は即座に行った。200 ml のガラス製培養容器を用い、シリコン栓で密閉した。気相の 10% をアセチレンガスで置換し、25°C で 30 分間培養した。測定は 10 時から 14 時に行った。培養後、ガスタイトシリンジでガスを 1 ml サンプリングし、FID 検出器のガスクロマトグラフ (GC-14B, SHIMADZU, Kyoto, Japan) でエチレン生成量を分析した。炭化水素の分離には 100 / 120-mesh Porapak N を充填した 1.0 m ガラスカラムを用いた。検出器の温度は 75°C、カラム温度は 60°C に設定した。窒素ガスをキャリアガスとして用いた。アセチレンガスのみのサンプルもエチレン混入を確認し、補正するために分析した。一定環境下での予備実験で、培養時間に対して少なくとも 3 時間はエチレン生成量が直線的に増加することを確認した。アセチレン還元法の問題点の一つに、根粒をアセチレン下にさらしたときに 2 - 3 分以内にニトロゲナーゼ活性が低下する点が挙げられている (Schwintzer and Tjepkema 1994)。しかし、ハンノキ属の樹種ではアセチレンを加えたときの活性の低下が少ないため、ニトロゲナーゼ活性を閉鎖系の培養容器による測定でも誤差が少ないと考えられている (Schwintzer and Tjepkema 1994)。

4. 2. 4 成長とバイオマス配分

ニトロゲナーゼ活性の測定後、測定を行った苗木 (各処理 6 個体) を刈り取り、各器官の乾重量を測定した (80°C, 48 時間)。葉、当年枝、1 年枝、幹、根、根粒に分けた。根はさらに細根 (<2 mm) に分けた。葉面積を測定し、葉面積比 (LAR; 樹木個体重量あたりの葉面積) と T / R 比 (地上部/地

下部比) を算出した。

4. 2. 5 葉の窒素とリン含有量

各処理の刈り取り個体の乾燥葉の窒素含量を NC アナライザー (Vario Max CN; Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany) で分析した。粉碎した葉サンプルの約 0.1 g を 60% 硝酸と 60% 過塩素酸により湿式灰化した。リン含有量は、Murphy-Riley 法 (Murphy and Riley 1962; Schoelau and O' Halloran 2008) により分析し、712 nm の波長で分光光度計により定量した。

4. 2. 6 光合成特性

ニトロゲナーゼ活性の測定前に、老化の兆候がなく自己庇陰の少ない成熟葉について携帯型光合成蒸散測定装置 (LI-6400; Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) で光合成速度を測定した (各処理 6 枚)。葉齢は、ケヤマハンノキが 38 - 56 日、ミヤマハンノキが 34 - 46 日であった。開葉様式の違いから、ケヤマハンノキではリーダーシュートの先端から数えて 6 - 8 番目の葉を測定し、ミヤマハンノキではリーダーシュートの基部から 2 - 3 番目の葉を測定した。Dry の個体は灌水の翌日に光合成活性を測定した。飽和光下 (PPFD 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) での葉内間隙 CO_2 濃度 (C_i) と単位葉面積あたりの光合成速度 (A_{sat}) の関係を調べた。飽和光は光合成速度の光依存性の結果を基に決定した (データは示していない)。通常の CO_2 濃度 (360 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$) で測定を開始し、200、100、50 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ と下げた後、360、500、720、1000、1500、1800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ へ上昇させて、10 点で測定した。パラメータの算出方法は第 3 章 (3. 2. 2. 3) に準じた。

4. 2. 7 統計解析

スプリットプロットデザインの 3-way ANOVA で、ニトロゲナーゼ活性、成長特性 (各器官のバイオマス、個体全体のバイオマス、葉面積、葉面積比)、生理的特性 (A_{sat} , V_{cmax})、葉の性質 (窒素含有量、リン含有量、N/P 比) に及ぼす、 CO_2 処理、土壌リン酸処理、土壌水分処理の影響を解析した (JMP; SAS Institute 2003; $P < 0.05$)。 $P < 0.15$ を傾向があると解釈した。根重量、根粒重量、葉面積の処理間差を、処理を要因として共分散分析 (ANCOVA) で解析した。これらのパラメータはサイズ依存的であるため、個体総重量を共変数として解析した。ケヤマハンノキの根重量を除いて、必ずしも個体総重量と有意な相関を示さなかった。そのため、2 つのリン酸処理のデータをまとめて解析を行った。まず、処理 (CO_2 と土壌水分処理) と個体総重量の間の交互効果の検定を行った。も

しこの交互効果が有意でない場合、交互効果の項を除外して解析を続けた。もし交互効果が有意な場合は、それぞれの土壌水分処理について CO₂ 処理と個体総重量の間の交互効果の検定を行った。

4. 3 結果

4. 3. 1 根粒のニトロゲナーゼ活性

2 樹種とも単位根粒重量あたりのニトロゲナーゼ活性 (アセチレン還元活性: ARA) に対して処理 (CO₂, 土壌リン酸供給量、土壌水分) による有意な影響はなかった (図 1)。ケヤマハンノキでは、土壌リン酸供給量、土壌水分、CO₂ 処理間の交互効果の傾向があった ($P = 0.087$; 図 1A)。ミヤマハンノキでは、CO₂ 処理と土壌水分処理の間に交互効果の傾向があり ($P = 0.098$; 図 1B)、通常 CO₂ 条件では、湿潤土壌 (Wet) より乾燥土壌 (Dry) でニトロゲナーゼ活性が高い傾向を示したが、高 CO₂ ではこの傾向は不明瞭であった。

4. 3. 2 根粒バイオマス

2 樹種とも樹木個体あたりの根粒重量に対する高 CO₂ と土壌水分処理の影響は、リン酸供給量の処理間で大きく異なった (図 2)。根粒重量に対して、2 樹種で土壌リン酸処理と土壌水分処理の交互効果が見られ ($P = 0.0006$ (ケヤマハンノキ), $P = 0.007$ (ミヤマハンノキ))、ケヤマハンノキでは土壌リン酸処理と CO₂ 処理の交互効果 ($P = 0.027$)、ミヤマハンノキでは土壌リン酸処理と CO₂ 処理の交互効果の傾向 ($P = 0.13$) がそれぞれ見られた (図 2)。High-P では両種とも根粒重量が乾燥土壌 (Dry) で減少し、高 CO₂ で増加した。High-P では乾燥土壌条件でも通常 CO₂ に比べて高 CO₂ で根粒重量が増加した。Low-P では、2 樹種とも根粒重量の平均値が High-P に比べて大幅に減少し、高 CO₂ と土壌水分処理の効果が不明瞭であった。

4. 3. 3 樹体バイオマス

樹木個体の総重量は、根粒重量とほとんど同様の反応を示した (図 3)。ケヤマハンノキでは、樹木個体の総重量に対する CO₂ と土壌水分処理の影響はリン酸供給量の処理間で大きく異なった (図 3A)。一方、ミヤマハンノキでは、樹木個体の総重量に対して 3 処理間の交互効果がみられ ($P = 0.05$)、高 CO₂ による樹木個体の総重量の促進効果は、High-P の乾燥土壌 (Dry) でのみ見られた (図 3B)。この点は、根粒重量の結果と異なった。

4. 3. 4 バイオマス配分

樹木個体の総重量と根重量の関係では、2 樹種とも明瞭な処理間差を示さなかった (図 4A, B)。樹木個体の総重量と根粒重量の関係では、個体重量と土壤水分処理間で交互効果が見られ (ANCOVA; $P < 0.0001$; 図 4C)、樹木個体の総重量に対する根粒重量の関係の傾きは、CO₂ 処理に関わらず乾燥土壤 (Dry) で湿潤土壤 (Wet) より大きい傾向を示した。この傾向はケヤマハンノキで顕著であったが、ミヤマハンノキでは値の変動が大きかったため不明瞭であった (図 4D)。ケヤマハンノキでは各処理の樹木個体の総重量に対する根粒重量の比 (根粒重量比 NWR; g g^{-1}) の平均値は、土壤水分処理と土壤リン酸処理の間で交互効果を示した ($P = 0.006$; 図 4E)。High-P でのケヤマハンノキの根粒重量比 (NWR) は、乾燥土壤 (Dry; 約 0.019) で湿潤土壤 (Wet; 約 0.012) の約 1.6 倍高かった。ミヤマハンノキでは、根粒重量比 (NWR) に有意な土壤リン酸処理の効果が見られた ($P = 0.003$; 図 4F)。

樹木個体あたりの葉面積は 2 樹種とも High-P より Low-P で小さかった (図 5A, B)。樹木個体の総重量に対する葉面積の関係では、個体重量と CO₂ 処理間で交互効果が見られ (ANCOVA; $P = 0.0024$ (ケヤマハンノキ), $P = 0.013$ (ミヤマハンノキ)), 2 樹種とも通常 CO₂ に比べて高 CO₂ 下で葉面積が減少する傾向を示した。High-P 処理では、葉面積比 (LAR) の平均値の乾燥土壤処理に対する反応は CO₂ 処理と樹種により異なった (図 5C, D)。通常 CO₂ では、2 樹種とも葉面積比 (LAR) が湿潤土壤より乾燥土壤で増加した。一方、高 CO₂ では、ケヤマハンノキの葉面積比 (LAR) は乾燥土壤で増加せず (図 5C)、ミヤマハンノキの葉面積比 (LAR) は乾燥土壤処理で低下する傾向を示した (図 5D)。

4. 3. 5 葉の窒素とリン含有量

葉の窒素濃度は、2 樹種とも高 CO₂ 下で低下した ($P = 0.013$ (ケヤマハンノキ), $P = 0.015$ (ミヤマハンノキ); 表 1)。ケヤマハンノキの葉の窒素濃度は、土壤リン酸と土壤水分処理間の交互効果を示し ($P = 0.007$)、High-P では乾燥土壤で増加したが、Low-P では増加しなかった。ミヤマハンノキは、CO₂ と土壤リン酸処理間で交互効果を示した ($P < 0.0001$)。ミヤマハンノキでは、土壤水分処理の効果は見られなかった。

葉のリン濃度は、ケヤマハンノキでは、土壤リン酸と CO₂ 処理間で有意な交互効果が見られ、高 CO₂ 下で低下した ($P = 0.009$; 表 1)。また、土壤リン酸と土壤水分処理の間にも交互効果を示した (P

< 0.0001)。ミヤマハンノキでは、CO₂ と土壌リン酸処理間 ($P = 0.023$) と土壌リン酸と土壌水分処理間 ($P = 0.035$) に交互効果が見られた。High-P では、CO₂ 処理、もしくは、土壌水分処理間のリン酸濃度の差が Low-P よりも大きかった。

両種とも、葉の N / P 比に CO₂ 処理の効果は見られなかった (表 1)。両種とも土壌水分と土壌リン酸処理間の交互効果があった ($P = 0.001$ (ケヤマハンノキ), $P = 0.029$ (ミヤマハンノキ))。High-P では、2 樹種とも葉の N / P 比が乾燥土壌で低下する傾向を示し、Low-P では、葉の N / P 比に対する土壌水分処理の効果は種間で異なった。

4. 3. 6 光合成特性

2 樹種とも、最大炭酸固定速度 (V_{cmax}) は Low-P で High-P に比べて低下し ($P = 0.003$ (ケヤマハンノキ), $P = 0.002$ (ミヤマハンノキ))、高 CO₂ 下で低下した ($P = 0.010$ (ケヤマハンノキ), $P = 0.052$ (ミヤマハンノキ)) (図 6)。しかし、ケヤマハンノキの V_{cmax} は、土壌リン酸処理と土壌水分処理との間に交互効果の傾向が見られた ($P = 0.09$)。High-P では、土壌乾燥に対する V_{cmax} の反応が樹種により異なった。ケヤマハンノキは、CO₂ 処理にかかわらず湿潤土壌 (Wet) より乾燥土壌 (Dry) で V_{cmax} が上昇する傾向を示した (図 6A)。一方、ミヤマハンノキは CO₂ 処理に関わらず乾燥土壌での V_{cmax} の上昇を示さなかった (図 6B)。

それぞれの生育 CO₂ 条件で測定した光飽和光合成速度 (A_{sat}) (通常 CO₂ 処理は 36 Pa CO₂ で測定した値、高 CO₂ 処理は 72 Pa CO₂ で測定した値) は、2 樹種とも高 CO₂ で大幅に上昇した ($P = 0.055$ (ケヤマハンノキ), $P = 0.03$ (ミヤマハンノキ)) (図 7)。ただし、ケヤマハンノキの Low-P の湿潤土壌処理区は例外的に高 CO₂ での A_{sat} の上昇を示さなかった。ミヤマハンノキの A_{sat} は、乾燥土壌条件で湿潤土壌に比べて有意に低下した ($P = 0.0002$) が、ケヤマハンノキでは低下しなかった。

4. 4 考察

ハンノキ属 2 樹種、ケヤマハンノキとミヤマハンノキの窒素固定能力の高 CO₂ に対する反応は土壌中のリン酸供給量に大きく依存した。土壌中のリン酸供給量が不足する場合、両種とも樹木個体の成長が大幅に抑制され根粒重量が増加しなかったことに加えて、根粒のニトロゲナーゼ活性の処理間差も不明瞭であったため、樹木個体あたりの窒素固定量が高 CO₂ 下で増加しないことが示唆された (図 2, 3)。一方、土壌中のリン酸供給量が多い場合、両種とも、ニトロゲナーゼ活性の増加で

はなく(図 1)、樹木個体あたりの根粒重量の増加(図 2)により高 CO₂ 下で樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが示唆された。しかも、同様の高 CO₂ に対する反応は土壤水分条件にかかわらず、乾燥土壤条件でもみられた。土壤中のリン酸供給量が多い場合、高 CO₂ 下で生じた樹木個体あたりの根粒重量の増加は、相対成長関係の変化による根粒へのバイオマス配分比の増加ではなく、樹木個体の成長量の増加が原因であることが示唆された(図 4)。この結果は、第 3 章の結果と同様であった(3. 1 節)。ただし、特にケヤマハンノキでは、CO₂ 処理に関わらず根粒へのバイオマス配分比が湿潤土壤に比べて乾燥土壤条件で増加することが示唆された(図 4)。湿潤土壤に比べて乾燥土壤での成熟葉の窒素濃度の上昇と光合成能力 (V_{cmax}) の上昇はケヤマハンノキのみでみられ、高 CO₂ 条件下でも同様の反応を示した(表 1, 図 6)。ミヤマハンノキでは乾燥土壤に対する反応がケヤマハンノキに比べて不明瞭であったことから、乾燥土壤に対する光合成の順化反応の樹種間差が、ケヤマハンノキの根粒へのバイオマス配分の増加に寄与している可能性が推察された。

4. 4. 1 ニトロゲナーゼ活性と根粒バイオマス

窒素固定速度は、根粒重量の変化または根粒のニトロゲナーゼ活性の変化により生育環境条件の変化に対して順応することができる(Valverde et al. 2002)。ハンノキ属樹種の研究では、高 CO₂ では根粒重量の増加(Hibbs et al. 1995)、根粒のニトロゲナーゼ活性の上昇(Temperton et al. 2003)、または両方(Norby 1987; Arnone and Gordon 1990; Vogel et al. 1997)により樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが報告されている。今回の研究では、ケヤマハンノキとミヤマハンノキの両樹種で、High-P に限って、土壤水分条件に関わらず高 CO₂ で窒素固定速度が上昇することが示唆された。その原因は、根粒のニトロゲナーゼ活性の上昇ではなく、主に樹木個体の重量の増加に伴う個体あたりの根粒現存量の増加によることが示唆された(図 1, 2, 4)。

4. 4. 2 リン酸供給量不足の影響

窒素固定植物は窒素固定能を持たない植物に比べて潜在的なリン要求度が高く(Ingestad 1981)、リン施肥に対する反応が大きい(Israel 1987; Reddell et al. 1988)。これは、窒素固定に関わるリンの要求度が高いためである(Huss-Danell 1990; Uliassi and Ruess 2002; Dawson 2008)。今回の研究では、土壤中のリン酸供給量不足によりニトロゲナーゼ活性の低下ではなく、樹木個体あたりの根粒重量の減少が生じた(図 1, 2)。リン施肥を受けた土壤で育つハンノキ属樹種は、樹木個体の成長が増加したが、ニトロゲナーゼ活性は増加しないか、もしくは変化が少ないことが報告されている(Ekblad and

Huss-Danell 1995; Uliassi et al. 2000; Uliassi nad Ruess 2002)。しかし一方で、ニトロゲナーゼ活性がリン施肥により顕著に増加したという報告例もある (Russo 1989; Fraga-Beddiar and Le Tacon 1990)。Uliassi and Ruess (2002) は、ハンノキ属樹種のような高緯度に生育する窒素固定樹種は、ニトロゲナーゼ活性の変化ではなく、根粒重量の変化により効率的に窒素固定を調節しているという考えを示唆した。その理由として土壤温度が低い場所では窒素固定量の増加に寄与するニトロゲナーゼ活性の上昇の効果が顕著でなくなるためと考察している。今回実験に使用したケヤマハンノキとミヤマハンノキでも、Uliassi and Ruess (2002) と同様の考察が当てはまるかもしれない。

根粒の形成開始には十分なリン酸供給が必要になる (Huss-Danell 1997)。そのためハンノキ属樹種がフランキアとの間に共生関係を築くことができるかどうかは土壤中のリン酸供給能力に依存している (Wall et al. 2000)。本研究ではリン酸供給量不足の土壤での根粒重量の減少が、根粒形成の抑制によるのか、樹木の成長の制限によるのか明らかにすることはできなかった。リン酸供給量不足の土壤では、高 CO₂ 環境下でさえも、個葉の光合成の低下と葉面積の減少により樹木個体の成長量が抑制されたために、根粒の成長が制限されたのではないかと推察した (図 2, 4, 5, 6)。今回の実験では、高 CO₂ 条件でも個体あたりの根粒重量がリン酸不足の影響を受けることが明らかとなり、高 CO₂ 下でもハンノキ属樹種の樹木個体あたりの窒素固定量の増加のためには、リン酸供給が必要であることが示唆された。

4. 4. 3 根粒形成に対する土壤乾燥の影響

宿主の樹木が放線菌のフランキアとの共生関係を制御する方法の一つは、樹体内で共生組織の割合を制御することである (Wall and Berry 2008)。アクチノリザル植物では根粒形成に対して 2 段階のフィードバック制御機構が明らかにされている (Wall 2000)。根粒形成の初期に生じる「自動制御 (autoregulation)」 (Wall and Huss-Danell 1997) と、フランキアの感染と根粒形成に対する根の感受性の「固定された窒素による制御 (fixed-N regulation)」である (Parsons et al. 1993)。ハンノキ属樹種の根粒数は宿主樹木の自動制御プロセスにより決められ、その自動制御プロセスは窒素やリンなどの土壤養分状態により随時変化する (Huss-Danell 1997; Wall et al. 2000)。例えば、リン酸供給量の増加により樹体重量に占める根粒重量の割合の増加や、樹木個体あたりの根粒数の増加が生じる (Wall et al. 2000)。今回の研究では、樹木個体重量に対する根粒重量の比 (NWR) は、両樹種で Low-P より High-P で増加し、その反応はケヤマハンノキの乾燥土壤で顕著であった (図 4)。特にケヤマハンノキでは、根粒へのバイオマス配分率は CO₂ 処理に関わらず湿潤土壤より乾燥土壤で増加する傾向を示した (図

4)。しかし、根粒数の測定をしていないため、この NWR の上昇が、形成された根粒数の増加によるものか根粒重量の増大によるものか区別することはできなかった。

今回の実験では処理開始時点ですでに根粒形成を確認していたため、根粒形成量の制御には「固定された窒素による制御」が寄与していると予想される。根粒形成の「固定された窒素による制御」は、樹木に感知される土壤の N / P 比に依存する (Ekblad and Huss-Danell 1995; Gentili and Huss-Danell 2003; Wall et al. 2000; Wall and Berry 2008)。土壤中のリン酸供給量の増加に伴い、土壤の窒素供給量による窒素固定の抑制が解除されたという研究結果により、土壤中の窒素とリン酸養分の絶対量よりも相対的な比率が根粒形成を左右することが示唆されている (Wall 2000; Gentili and Huss-Danell 2003)。今回の実験では、土壤中の窒素による根粒形成の抑制を避けるため、窒素の施肥量を通常の Hoagland 液の窒素配分量の 10 分の 1 の量に設定した。そのため、施肥した養分中の N / P 比 (モル比) は High-P では 1.5 : 1 (N / P = 1.5)、Low-P では 1.5 : 0.1 (N / P = 15) であった。特に High-P の湿潤土壤で個体重量に対して根粒重量が少ない傾向が見られたが、施肥の N / P 比が低いため、窒素供給量過剰による抑制ではないことが示唆される。

葉の N / P 比は群集レベルや生態系プロセスにおける養分制限の指標として利用される (Koerselman and Mueleman 1996)。樹木の養分状態を表す指標の一つとして、葉の N / P 比が 14 未満の場合に窒素制限、16 より大きい場合にリン制限を反映するということが提案されている (Koerselman and Mueleman 1996; Townsend et al. 2007)。アクチノリザル植物の 1 種 *Discaria trinervis* では、樹木個体重量に占める根粒重量の割合が葉の N / P 比と負の相関を示し、葉の N / P 比が 16 以上の範囲で根粒重量の割合が低下した (Valverde et al. 2002)。本研究では、ケヤマハンノキの High-P 処理でのみ、湿潤土壤に比べて乾燥土壤の葉の N / P 比が低下し、根粒重量比 (NWR) が増加する傾向を示した (表 1, 図 4)。葉の N / P 比により示唆される樹木の養分状態から判断しても、乾燥土壤処理において High-P が NWR の増加に寄与している可能性が示唆された (図 4)。しかし、他の処理では葉の N / P 比により NWR の反応を説明することはできなかった。

葉の N / P 比は 2 樹種とも高 CO₂ の影響を受けず、土壤水分条件と土壤リン酸供給量により変化した (表 1)。この結果は、葉内の養分バランスは高 CO₂ の影響を受けない可能性を示唆する。一方、マメ科植物の草本シロツメクサ (*Trifolium repens*) の植物体の N / P 比は高 CO₂ による影響を受けた (Edwards et al. 2006)。葉の N / P 比は土壤養分供給量の単純な関数ではなく、さまざまな要因が葉の化学性を制御することを考慮する必要があるかもしれない (Wright et al. 2001)。

ハンノキ属樹種の根粒の成長速度やニトロゲナーゼ活性が初秋に高く維持されていたことが報告

されている (Kaelke and Dawson 2003)。本研究では実験期間中の 2 年目の夏 (8 月) に 1 回だけ根粒重量の測定を行った。根粒成長が秋にも生じる場合、根粒重量の絶対量が夏と秋で異なるかもしれない。本研究では 2 生育期間の処理を行ったため、実験に用いたケヤマハンノキは処理期間の一年目に秋の時期を経験していることから、処理間の根粒重量の違いは各処理に対する反応を反映していると推察される。

4. 4. 4 高 CO₂ に対する光合成反応

葉の光合成により同化された炭素は、根粒組織とフランキア細胞の形成、成長、維持のために必要であり、窒素固定の過程や窒素の同化と輸送のためにも必要である (Huss-Danell 1997)。高 CO₂ 下で生育した場合、アクチノリザル植物は窒素不足の土壌でも光合成能力の低下 (ダウンレギュレーション) が少なく、高い CO₂ 同化速度を維持することができる (Dawson 2008)。本研究では、2 樹種とも高 CO₂ で V_{cmax} が低下する傾向を示したが (図 6)、生育環境の CO₂ 濃度での光合成速度は高 CO₂ で上昇した (図 7)。特に High-P の乾燥土壌では通常 CO₂ に比べて高 CO₂ で葉面積比 (LAR) が減少したが (図 5)、高 CO₂ 下での光合成速度の上昇が LAR の低下を補い、樹木個体あたりの光合成能力が高 CO₂ 下で増加することを示唆する。通常 2 倍の CO₂ 濃度で成長した *Alnus glutinosa* では、 V_{cmax} の低下が他の樹種に比べて少なく、通常 CO₂ 濃度に比べて、CO₂ 固定速度が 16% 増加し、根粒のニトロゲナーゼ活性が 46% 上昇したことが報告されている (Vogel and Curtis 1995)。

4. 4. 5 乾燥土壌に対する光合成の順化反応

High-P 条件下のみであるが、通常 CO₂ では 2 樹種とも葉面積比 (LAR) が湿潤土壌に比べて乾燥土壌下で増加した (図 5)。さらに、ケヤマハンノキでは、 V_{cmax} が、CO₂ 処理にかかわらず湿潤土壌に比べて乾燥土壌で上昇し、土壌乾燥に対する光合成の順化反応が見られた (図 6)。同様の乾燥土壌に対する光合成の順化反応は、高 CO₂ 環境下で生育させたシラカンバ (Kitao et al. 2007) や草本種のセイヨウアブラナ (Qaderi et al. 2006) で報告されている。乾燥土壌に対する光合成反応は、高 CO₂ に対する光合成能力の低下 (ダウンレギュレーション) の反応を緩和するかもしれないと予想されている (Kitao et al. 2007)。乾燥土壌条件では、光合成能力の上昇により過剰の光合成生産物が生じ、その結果、根粒への光合成生産物の配分が増加した可能性も考えられる。このように、乾燥土壌に対する光合成の順化反応は、ケヤマハンノキで見られた乾燥土壌での根粒重量比の増加に寄与しているかもしれない。

ミヤマハンノキは、ケヤマハンノキに比べて、縮合タンニンのような葉内の被食防衛物質が多いことが報告されている (Agari et al. 2007)。これら縮合タンニンなどの被食防衛物質は光合成生産物を利用して合成されるため、ミヤマハンノキでは根粒に配分される光合成生産物量がケヤマハンノキに比べて少ないことが推察される。その結果、ミヤマハンノキでは、乾燥土壌に対する光合成の順化や根粒のバイオマス配分の増加がケヤマハンノキに比べて顕著でなかったのかもしれないと推察された (図 4, 6)。

4. 4. 6 ニトロゲナーゼ活性

ニトロゲナーゼ活性は短期的な土壌乾燥に対して敏感に反応する (Seiler and Johnson 1984; Huss-Danell 1997)。本研究では、根系を洗浄した後に根粒を採取しニトロゲナーゼ活性を測定した。つまり、土壌乾燥時の活性ではなく、湿潤状態にした場合の根粒のニトロゲナーゼ活性を評価したことを意味する。*Alnus incana* ssp. *incana* では、葉の水ポテンシャルが -0.6 MPa から、気孔閉鎖が生じしおれが始まるような土壌乾燥条件に相当する -1.4 MPa まで低下するとニトロゲナーゼ活性が低下した (Sundström and Huss-Danell 1987)。本研究の乾燥土壌処理では、生育時期の 1 週間の灌水スケジュールの間で最も乾燥する日の早朝の葉の水ポテンシャルが両種とも -1.2 MPa まで低下した (データは示していない)。この場合、ニトロゲナーゼ活性はある程度低下することが予想される。しかし、定期的な灌水の後には、早朝の葉の水ポテンシャルは両種とも約 -0.1 MPa まで回復した。このことは、根粒のニトロゲナーゼ活性が本研究で示した根を湿らせた時の値より常に低い訳ではないことを意味する。ハンノキ属樹種が乾燥条件に順化した場合、根粒のニトロゲナーゼ活性がある程度の乾燥まで影響を受けなくなるという報告もあるが (Seiler and Johnson 1984)、今後、乾燥時のニトロゲナーゼ活性の評価が必要と考える。

4. 4. 7 外生菌根菌とフランキアとハンノキ属樹種間の三者共生関係

Yamanaka et al. (2003) は、根粒を形成している *Alnus tenuifolia* について、外生菌根菌が存在することにより無機養分の可溶化が進み、リン酸の吸収が改善され、その結果、宿主植物の成長と窒素固定が増加するという、ハンノキ属樹木とフランキアと外生菌根菌の三者共生の利点を示した。本研究では、菌根菌の効果について焦点を当てなかったが、全ての樹木個体で外生菌根の形成が観察された (データは示していない)。今後、土壌中のリン酸供給量に対する反応を調べる際には、外生菌根菌やアーバスキュラー菌根菌とフランキアとハンノキ属樹種間の共生関係に対する高 CO_2 の影

響を評価する研究が必要であると考え。また今回は、リン酸供給量が極端な 2 段階のみの設定だった (High-P と Low-P) ため、リン酸供給量を数段階処理した実験が望まれる。

4. 4. 8 まとめ

根粒のニトロゲナーゼ活性の変化よりも樹木個体の成長にともなう根粒重量の増加のほうが、個体の窒素固定量に対する影響が大きいことが示唆された。高 CO₂ で、樹木個体の成長量増加にともなう根粒重量が増加することにより、個体あたりの窒素固定量が増大すると考えられる。CO₂ 処理ではバイオマス配分は変化しなかったが、特に、ケヤマハンノキでは、乾燥により根粒へのバイオマス配分が増加することが示唆された。リン酸供給量が十分な場合、土壤の乾燥により樹木個体の成長量は低下するが、湿潤土壤の場合と同様に、高 CO₂ による根粒重量の促進効果が生じたことから、土壤乾燥ストレス下でも高 CO₂ により樹木個体あたりの窒素固定量が通常 CO₂ の乾燥条件に比べて増加する可能性が示唆された。一方、リン酸供給量不足では樹木個体の成長量が顕著に抑制され、根粒重量の増加が生じず、高 CO₂ による窒素固定量の促進効果が現れないことが示唆された。今回の実験結果からは、ハンノキ属樹木の高 CO₂ 応答に対して、リン酸供給量不足の影響のほうが、土壤乾燥の効果よりも大きいことが示唆された。

表1 ケヤマハンノキとミヤマハンノキの葉の窒素濃度 (mg g^{-1})、葉のリン濃度 (mg g^{-1})、葉の N/P 比。値は平均値 \pm 標準誤差を示す ($n = 6$)。それぞれのパラメータに対する CO_2 、土壌リン酸、土壌水分の各処理の効果と処理間の交互効果についての分散分析 (F 値と P 値) の結果を示す。n.s. は統計的に有意でないことを示す ($P > 0.15$)

	<i>Alnus hirsuta</i>						<i>Alnus maximowiczii</i>					
	leaf N (mg g^{-1})		leaf P (mg g^{-1})		leaf N/P		leaf N (mg g^{-1})		leaf P (mg g^{-1})		leaf N/P	
High-P												
Ambient CO_2 - Wet	15.6 \pm 0.96		1.01 \pm 0.03		15.7 \pm 1.32		16.7 \pm 0.61		0.74 \pm 0.10		24.6 \pm 3.54	
Elevated CO_2 - Wet	13.8 \pm 0.44		0.90 \pm 0.06		15.5 \pm 0.92		11.5 \pm 1.12		0.51 \pm 0.13		29.7 \pm 6.59	
Ambient CO_2 - Dry	20.8 \pm 1.19		1.82 \pm 0.20		12.1 \pm 1.44		18.7 \pm 0.97		1.38 \pm 0.17		14.3 \pm 1.32	
Elevated CO_2 - Dry	15.8 \pm 0.92		1.17 \pm 0.15		14.2 \pm 1.32		12.6 \pm 0.70		0.88 \pm 0.06		14.5 \pm 0.82	
Low-P												
Ambient CO_2 - Wet	14.4 \pm 0.65		0.80 \pm 0.05		18.2 \pm 0.91		14.6 \pm 0.86		0.69 \pm 0.04		21.8 \pm 1.93	
Elevated CO_2 - Wet	12.5 \pm 0.84		0.67 \pm 0.04		18.8 \pm 1.01		13.0 \pm 0.54		0.67 \pm 0.01		19.4 \pm 0.56	
Ambient CO_2 - Dry	15.0 \pm 0.94		0.65 \pm 0.09		24.6 \pm 2.96		14.2 \pm 0.87		0.85 \pm 0.05		16.8 \pm 1.11	
Elevated CO_2 - Dry	11.7 \pm 0.78		0.50 \pm 0.06		25.5 \pm 3.39		13.6 \pm 1.09		0.84 \pm 0.13		17.0 \pm 1.07	
Source of variance	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
CO_2	15.8	0.013	18.5	0.009	2.0	n.s.	16.8	0.015	9.2	0.038	0.1	n.s.
P	15.1	0.014	180.8	<0.001	31.2	0.003	45.1	0.002	5.2	0.084	0.8	n.s.
P x CO_2	1.2	n.s.	12.4	0.009	0.1	n.s.	241.2	<0.001	12.7	0.023	0.8	n.s.
water	8.7	0.036	7.3	0.048	0.2	n.s.	0.6	n.s.	25.8	0.007	15.7	0.017
water x CO_2	2.4	n.s.	5.5	0.072	1.2	n.s.	0.0	n.s.	0.9	n.s.	0.0	n.s.
water x P	8.5	0.007	22.7	<0.001	15.3	0.001	2.1	0.149	4.9	0.035	5.3	0.029
water x P x CO_2	1.3	n.s.	3.8	0.060	0.6	n.s.	0.8	n.s.	0.7	n.s.	1.0	n.s.

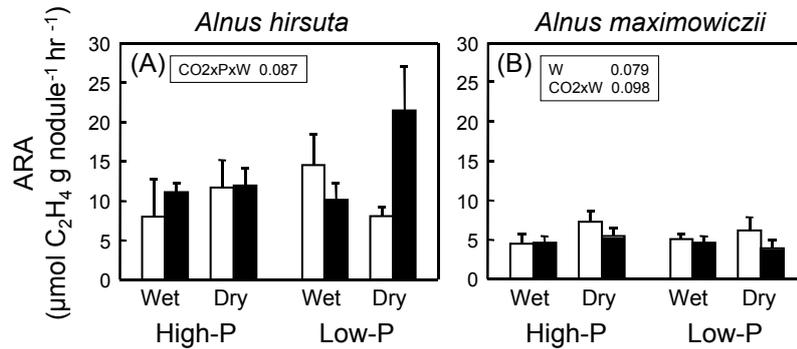
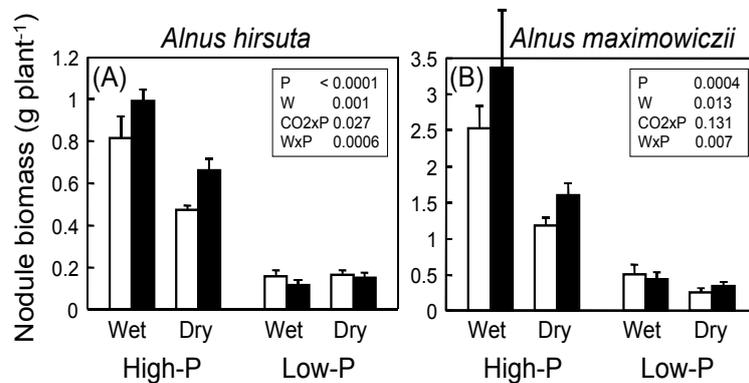


図 1. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A) とミヤマハンノキ (*Alnus maximowiczii*) (B) の単位根粒重量あたりのニトロゲナーゼ活性(アセチレン還元活性; ARA)。値は平均値 + 標準誤差を示す ($n=6$)。通常 CO_2 , 白棒; 高 CO_2 , 黒棒。High-P, High-P 処理; Low-P, Low-P 処理; Wet, 湿潤処理、Dry; 乾燥処理。three-way



ANOVA の結果を示す ($P < 0.15$)。W, 土壤水分処理

図 2. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A) とミヤマハンノキ (*Alnus maximowiczii*) (B) の樹木個体あたりの根粒重量。値は平均値 + 標準誤差を示す ($n=6$)。通常 CO_2 , 白棒; 高 CO_2 , 黒棒。High-P, High-P 処理; Low-P, Low-P 処理; Wet, 湿潤処理; Dry, 乾燥処理。three-way ANOVA の結果を示す ($P < 0.15$)。W, 土壤水分処理

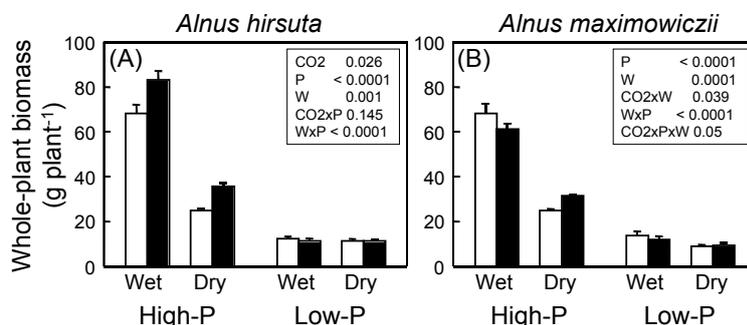


図 3. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A) とミヤマハンノキ (*Alnus maximowiczii*) (B) の樹木個体重量。値は平均値 + 標準誤差を示す ($n=6$)。通常 CO_2 , 白棒; 高 CO_2 , 黒棒。High-P, High-P 処理; Low-P, Low-P 処理; Wet, 湿潤処理; Dry, 乾燥処理。three-way ANOVA の結果を示す ($P < 0.15$)。W, 土壤水分処理

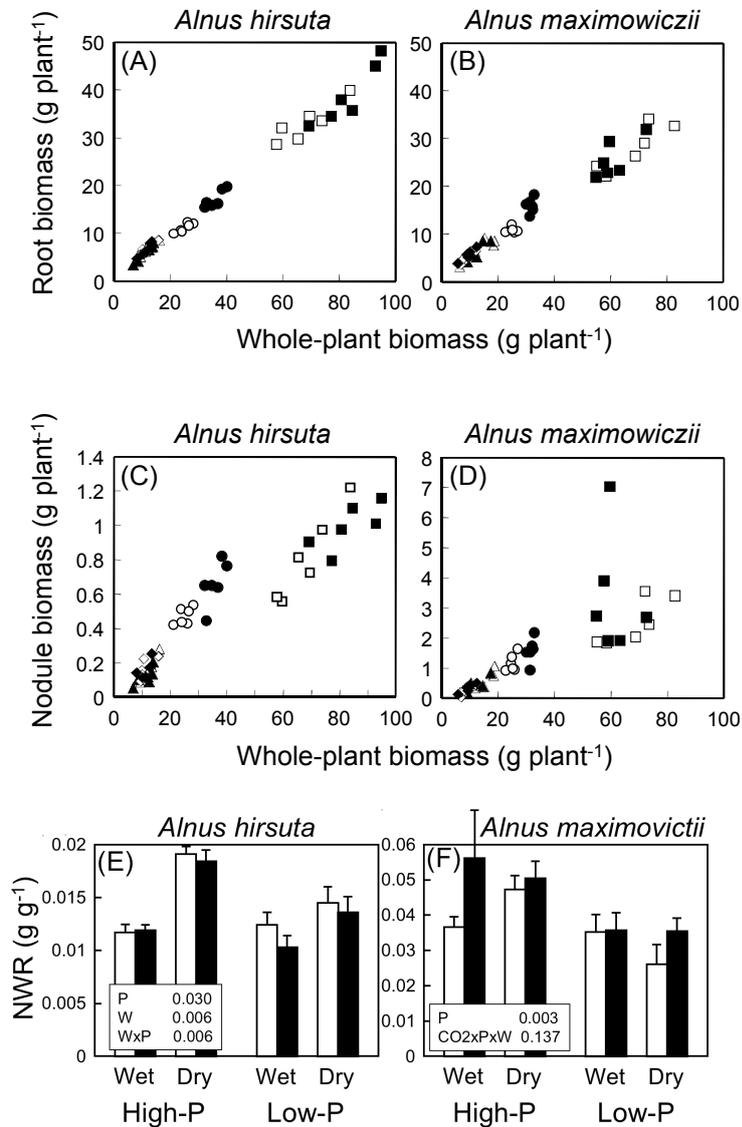


図4. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A, C) とミヤマハンノキ (*Alnus maximowiczii*) (B, D) の樹木個体重量と、根重量 (A, B)、根粒重量 (C, D) の関係。通常 CO₂, 白; 高 CO₂, 黒。High-P / Wet (四角); High-P / Dry (丸); Low-P / Wet (三角); Low-P / Dry (菱形)。ケヤマハンノキ (E) とミヤマハンノキ (F) の樹木個体重量に対する根粒重量の比 (根粒重量比; NWR)。値は平均値 + 標準誤差を示す ($n = 6$)。通常 CO₂, 白棒; 高 CO₂, 黒棒。High-P, High-P 処理; Low-P, Low-P 処理; Wet, 湿潤処理; Dry, 土壌乾燥処理。three-way ANOVA の結果を示す ($P < 0.15$)。W, 土壌水分処理

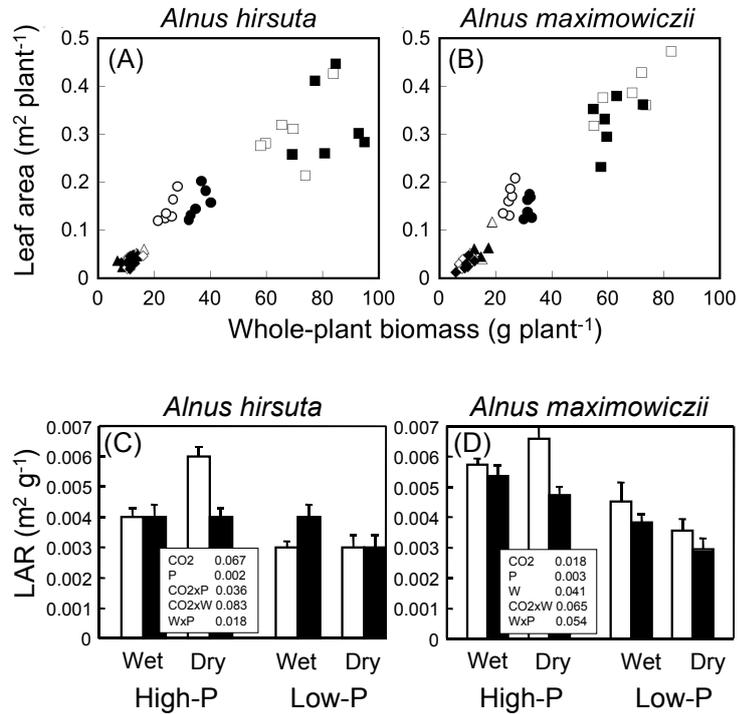


図 5. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A) とミヤマハンノキ (*Alnus maximowiczii*) (B) の樹木個体重量と葉面積の関係。通常 CO₂, 白; 高 CO₂, 黒。High-P/Wet (四角); High-P/Dry (丸); Low-P/Wet (三角); Low-P/Dry (菱形)。ケヤマハンノキ (C) とミヤマハンノキ (D) の樹木個体重量に対する葉面積の比 (葉面積比; LAR)。値は平均値 + 標準誤差を示す ($n=6$)。通常 CO₂, 白棒, 高 CO₂, 黒棒。High-P, High-P 処理; Low-P, Low-P 処理; Wet, 湿潤処理; Dry, 土壌乾燥処理。three-way ANOVA の結果を示す ($P < 0.15$)。W, 土壌水分処理

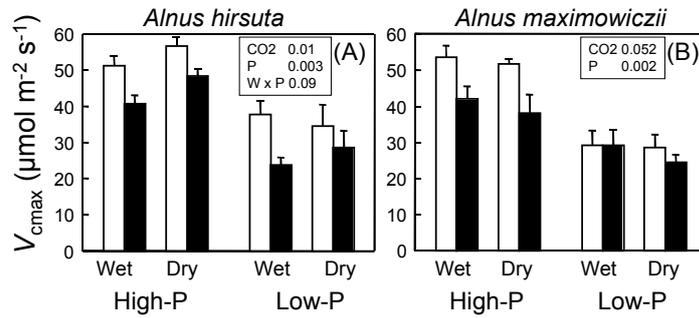


図 6. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A) とミヤマハンノキ (*Alnus maximowiczii*) (B) の最大炭酸固定速度 (V_{cmax})。値は平均値 + 標準誤差を示す ($n=6$)。通常 CO_2 、白棒; 高 CO_2 、黒棒。High-P, High-P 処理; Low-P, Low-P 処理; Wet, 湿潤処理; Dry, 土壌乾燥処理。three-way ANOVA の結果を示す ($P < 0.15$)。W, 土壌水分処理

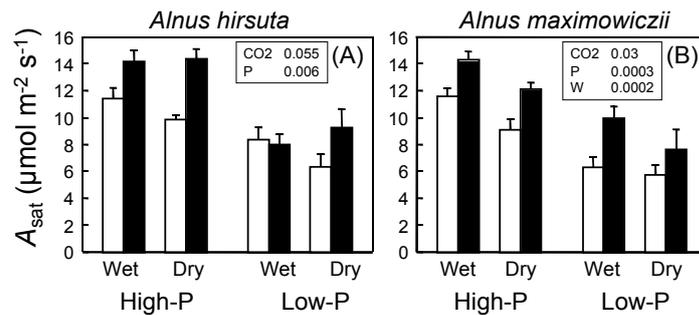


図 7. ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) (A) とミヤマハンノキ (*Alnus maximowiczii*) (B) のそれぞれの生育環境 CO_2 における光飽和光合成速度 (A_{sat})。値は平均値 + 標準誤差を示す ($n = 6$)。通常 CO_2 (36 Pa での測定値)、白棒; 高 CO_2 (72 Pa での測定値)、黒棒。High-P, High-P 処理; Low-P, Low-P 処理; Wet, 湿潤処理; Dry, 土壌乾燥処理。three-way ANOVA の結果を示す ($P < 0.15$)。W, 土壌水分処理

第5章

総合考察

共生的生物窒素固定は森林生態系の窒素循環の中の収入経路として重要な位置を占める。しかし自然状態の森林における窒素固定量についてデータは依然として不足している (Vitousek et al. 2002; Dawson 2008)。また、大気中の CO₂ 濃度の上昇は重要な問題の一つであるが (IPCC 2007)、将来の高 CO₂ に対する樹木の成長応答には、土壌の窒素供給量が大きく影響を及ぼすことが予想されており (Ainworth and Rogers 2007)、窒素固定樹種による森林生態系への窒素の供給が注目されている (Houghton et al. 2001)。本研究では、前半部分で、道路工事により土壌の攪乱を受けた立地に天然更新したケヤマハンノキ林分において林分レベルの窒素固定量の評価を行った (第2章)。後半部分では、大気 CO₂ 濃度の上昇がケヤマハンノキの根粒形成や光合成特性、成長に及ぼす影響を明らかにするために、ポット苗を用いた CO₂ 付加実験を行い、高 CO₂ と土壌中の窒素供給量の複合影響 (第3章) と、高 CO₂ と土壌中のリン酸供給量不足と土壌乾燥の複合影響 (第4章) を評価した。特に後半部分の生育環境の資源量の変化に対するケヤマハンノキの光合成・成長応答解明では、放線菌のフランキアと根系で共生し窒素固定能力をもつハンノキ属樹種のケヤマハンノキを、「シンク能を高く維持することのできる樹種」ととらえ、高 CO₂ 環境下での光合成応答について、他の窒素固定能を持たない樹種と異なる、窒素固定樹種の特殊性の解明に焦点を当てた。

第5章では、前半部分のケヤマハンノキの天然更新林分での窒素固定量の評価についてこれまでの報告例との比較考察を行い (5. 1)、後半部分の CO₂ 付加実験については、2つの実験から得られた結果を併せて、生育環境の資源量変化 (大気 CO₂、土壌養分、土壌水分) に対するケヤマハンノキの生理的・形態的応答を総合的に評価し、特に高 CO₂ 下での光合成のダウンレギュレーションを回避するメカニズムに見られる窒素固定樹種の反応の特殊性に焦点を当てて考察を行った (5. 2)。

5. 1 ケヤマハンノキ天然更新林分での窒素固定量の推定

寒帯から温帯域では、フランキアと共生するアクチノリザル植物が森林生態系における窒素固定の大きな部分に寄与していると考えられている (Dawson 1983; Tjepkema et al. 1986; Dawson 2008;

Pawlowski and Newton 2008)。アクチノリザル植物であるハンノキ属樹種の起源は、種数の多さと固有種の多さから日本を含む北東アジアが中心と考えられている (Murai 1964; Somego 1985; Navarro et al. 2003; Dawson 2008)。しかし、多くのハンノキ属樹種が生育している日本でも、ハンノキ属樹種の窒素固定に関する研究は多くなく、特に成木に関する林分レベルでの窒素固定量の推定の研究が不足している (Tsutsumi 1993; Yamanaka et al. 2003, 2005)。そこで本研究の前半部分では、林道建設により土壌が攪乱された立地に天然更新した約 18 年生のケヤマハンノキ林分を調査地として、データの不足している成木の林分あたりの窒素固定量を推定することを目的とした。

5. 1. 1 推定窒素固定量と林分内窒素循環における寄与

対象としたケヤマハンノキの天然更新林分の単位面積あたりの窒素固定量は、アセチレン還元活性の換算に換算比 3 を用いた場合 $56.4 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (1996 年は $60.2 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$)、換算比 4 の場合 $42.3 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (1996 年は $45.2 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) と推定された。この結果は、これまでに報告されている林分あたりの窒素固定量、数 $\text{kg N ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ から $320 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (Hibbs and Cromack 1990; Huss-Danell 1990; Hurd and Schwintzer 1996; Hurd et al. 2001; Samborn et al. 2002; Sharma et al. 2002; Lee and Son 2005; Son et al. 2007) の範囲内であった (2. 2 節, 表 5)。これらの値の中には北東アジアでのハンノキ属人工林での推定値 (Lee and Son 2005; Son et al. 2007) も含まれている。単位体積の土壌中に含まれる根粒重量から算出した根粒バイオマスとアセチレン還元法により求めた根粒のニトロゲナーゼ活性を用いて推定した *Alnus hirsuta* 人工林の窒素固定量は、38 年生で約 $60 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (Lee and Son 2007)、27 年生で約 $47 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ (Son et al. 2007) であり、手法が異なる人工林での推定値であるが、本研究の結果と同程度の結果であった。

本調査地ではケヤマハンノキの窒素吸収量に関する調査を行っていない。7 年生から 56 年生の *A. nepalensis* 人工林では、窒素吸収量に対するリターフォールにより土壌へ供給される窒素の割合は約 35% から 59% であり、本研究の調査林分と林齢の近い 17 年生の林分では 54% であった (Sharma and Ambasht 1988; Sharma 1993)。本調査地では林分の落葉中に含まれる窒素量に対して、窒素固定量は 66.4% (換算比 4 の場合 49.8%) に相当した (2. 2 節, 図 10)。窒素吸収量に対するリターフォール中の窒素の割合にこの文献値 (54%) を用いた場合、本調査地での窒素吸収量に対する窒素固定の寄与率は約 36% (換算比 4 の場合; 約 27%) と推定できた。また、分解により新鮮葉リターから 1 年間に土壌に放出される窒素量は、推定窒素固定量の 76.1% (換算比 4 の場合 101.3%) に相当した。単純に推定した土壌中の年間窒素蓄積量は、今回推定された窒素固定量の 110.8% (換算比 4

の場合 147.6%) に相当した。ヤマハンノキの窒素固定能力により吸収された窒素の一部は、生葉の高い窒素濃度 (約 3.5%) と落葉時の低い窒素引き戻し率 (約 22%) により生じた窒素濃度の高い葉リター (約 2.8%) の林床への供給と、葉リターの早い分解速度を通じて、速やかに土壤に供給されていることが明らかになった。

5. 1. 2 ニトロゲナーゼ活性の推定方法

本研究で示したケヤマハンノキの根粒 1 g あたりのニトロゲナーゼ活性 (アセチレン還元活性; Acetylene reduction activity, ARA) の季節変化とフェノロジーとの関係は、冬期落葉性のアクチノリザル植物 (ハンノキ属 (*Alnus*), *Hippophae*, *Purshia*, ヤマモモ属 (*Myrica*) など) で報告されている (Schwintzer et al.1982; Sharma et al. 2010) 典型的なものであった (2. 2節, 図 1, 4)。

林分内の被圧個体の年間幹直径増加量は、林冠を形成する個体に比べて少なかったが (2. 2節, 図 2)、被圧個体のニトロゲナーゼ活性 (ARA) は、生育期間を通して林冠構成個体と同程度の値を示し、dbh と ARA の間に一貫した傾向はみられなかった (2. 2節, 図 5)。樹木個体あたりの根粒バイオマスは dbh の増大に伴い増加したため (2. 1節, 図 9)、被圧個体の個体あたりの窒素固定量は、根粒 1 g あたりの活性によってではなく、個体あたりの根粒バイオマスの違いにより林冠構成個体に比べて少ないことが明らかになった。

本研究では、樹木個体サイズに伴う根粒サイズ構造の変化をニトロゲナーゼ活性の推定モデルにおいて考慮した。ハンノキ属樹種のようなアクチノリザル植物の根粒は、マメ科植物の根粒と異なり多年生で、根の形態を残している (Baker and Schwintzer 1990; Huss-Danell 1997)。本研究では、根粒に付随する根の根粒基部での直径 (付随する根の直径) 根粒サイズを表す指標として用いた。その結果、ケヤマハンノキ 1 個体内に様々なサイズの根粒が存在し、さらに、根粒のサイズ頻度分布が樹木個体サイズにより変化することが明らかになった (2. 1節, 図 6, 7)。ニトロゲナーゼ活性の推定モデルを比較した場合、根粒サイズを考慮した場合に比べて、根粒のサイズを考慮しない場合に推定窒素固定量が多くなった (2. 2節, 表 4-3)。根粒のサイズの増加と伴に老化して窒素固定を行わない部分の割合が増加するため、根粒サイズにより根粒 1 g あたりのニトロゲナーゼ活性が変化する (Sharma and Ambasht 1984; Huss-Danell 1990; Hurd et al. 2001) ことが影響したと考えられる。今回の方法により、列状に分布したケヤマハンノキ林分でも数個体の根粒量調査をもとに窒素固定量の推定ができることを示すことができた。しかし、他の林分で同じ方法を用いるためには、根粒サイズ構造を調べる必要があり、一般化は難しいことが推察される。根粒のサイズ構造を考慮

しない場合、アセチレン還元法の測定に用いる根粒のサイズに窒素固定量の推定結果が左右されるため、測定時の根粒サンプリングを慎重に行うことが必要となる。

5. 1. 3 根粒バイオマスの推定方法

林分あたりの窒素固定量の推定を行う際の基礎データとなる根粒バイオマスの推定においても多くの仮定が必要となる。本研究で得られた根粒バイオマスの推定結果に関して、年間の落葉量に対する割合により評価を試みた。根粒形成や窒素固定には光合成生産物の供給がエネルギーとして必要であるため、葉と根粒のバイオマスの比率は、ある程度の範囲内に制御されると考えることが妥当である。ただし、根粒形成は宿主植物側の制御により生育条件に応じて抑制される (Huss-Danell 1997; Wall et al. 2000; Wall and Berry 2008) ため、葉と根粒のバイオマスの比率は同一林分でも林齢の変化に伴う立地環境条件の変化により変動することを認識する必要がある。年間の落葉量に対する根粒バイオマスの比として 5.6 - 9.8% という値が報告されている (Akkermans and Dijk 1976; Tripp et al. 1979; Binkley 1981; Bormann and Gordon 1984)。本研究の推定結果ではケヤマハンノキ林分における年間の落葉量に対する根粒バイオマスの比は 2.7% であり (2. 1 節、2. 2 節)、これまでの報告に比べると低かった。本調査林分の落葉量 (3.07 t ha^{-1} ; 2. 2 節, 表 2) は、他のハンノキ属樹種の林分と同程度の値であった (Sharma and Ambasht 1987; Rytter 1989, 2. 2 節, 表 6)。また、土壌中の窒素蓄積量が過剰になっているわけではないことや (2. 2 節, 図 9)、ニトロゲナーゼ活性の値が他の研究例と比べて低いわけではないことから (2. 2 節, 図 4)、宿主であるケヤマハンノキによる根粒形成抑制により根粒重量の比率の低下が生じているわけではないと推察される。本研究で根粒バイオマス推定の対象とした樹幹周囲 1 m の範囲を合計した面積は、調査地面積 ($30 \text{ m} \times 35 \text{ m}$) の約 3 分の 1 にしか相当しなかったため、調査地面積を元に計算した林分あたりの根粒バイオマス (kg ha^{-1}) は過少評価になる可能性がある。特に、調査林分内のサイズの大きな樹木個体に関しては、樹冠面積よりも狭い範囲での評価となった。ケヤマハンノキの根粒が樹冠面積を超えて分布していたという研究例があることから (Okabe 2002)、本研究での根粒バイオマスの評価 (84.1 kg ha^{-1}) は過小評価である可能性が高い。ケヤマハンノキの根系は水平には限られた範囲しか発達せず、幹の周囲に集中する傾向があるとされているが (Karizumi 1979)、根粒バイオマスをより精度高く把握するためには、少なくとも樹冠面積の範囲内の調査が望まれる。

5. 1. 4 根粒の分布様式

海外のハンノキ属樹種に関する野外林分における窒素固定量の報告例の多くは人工林が対象であるが、日本ではハンノキ属樹種の人工林は少ないため、天然更新林分でハンノキ属樹種の窒素固定量の評価を行った。調査したケヤマハンノキの約 18 年生の天然更新林分では、胸高直径 (dbh) が 2.3 cm から 20.8 cm (平均 12.4 cm) と変動が大きく、ケヤマハンノキの分布も一様な規則分布ではなく集中分布を示した (2. 1 節, 図 1, 2, 3)。本調査地のように土壌が攪乱を受けた後に一斉に天然更新した同齢林分であっても、林分内の樹木個体サイズの違いにより、根粒の水平分布の変動が大きいことが予想され、林齢の異なる人工林の林分間で報告されているような根粒の水平分布の変動 (Rytter 1989) が、同齢の天然更新林分内で見られる可能性が考えられた。本研究で対象としたケヤマハンノキの同齢天然更新林分 (約 18 年生) では、幹の周囲の単位面積あたりの根粒数と根粒バイオマスの水平分布は幹からの距離と樹木個体サイズ (dbh) に依存して大きく変動した (2. 1 節, 図 4, 5, 8, 9A)。特に、被圧個体を含む dbh の小さな樹木個体では、根粒密度の空間変動が大きく、幹に近い部分の根粒密度が高かった。反対に、dbh の大きな樹木個体 (林分内の平均 dbh は 12.4 cm) では、幹からの距離の違いによる根粒密度の変動が少なかった (2. 1 節, 図 4)。人工林では樹木の分布が規則的なため、単位体積あたりの土壌中に含まれる根粒量から林分あたりの根粒量を推定する方法 (Rytter 1989; Lee and Son 2005; Son et al. 2007) の利用も適当と考える。天然更新林分では、樹木の分布と樹木個体サイズの両方が人工林に比べてより不均一のため、本研究の結果で示された単位面積あたりの根粒数と根粒バイオマスの空間的不均一さは林分あたりの根粒バイオマス推定の際に考慮すべき点と考える。ハンノキ属樹種の根粒は、太根と細根の中間的な分布様式を示すことが報告されているが (Rytter 1989)、細根の分布も個々の個体の位置に依存する場合もあることから (Yanai et al. 2006)、本研究結果で示したように、根粒の分布も樹木の分布様式に影響を受けることが予想される。そのため、天然更新林分で根粒を調査する際には、樹木の分布様式と樹木個体サイズを考慮する必要があると考える。

5. 1. 5 窒素固定量の推定方法

現実的には、さまざまな要因が影響して活性が変動するのでニトロゲナーゼ活性の真値を決めることは難しい (Huss-Danell 1990)。アセチレン還元法は、換算比の問題もあり、窒素固定を過小評価することがアクチノリザル植物でも報告されている (Schwintzer and Tjepkema 1997)。ニトロゲナーゼ活性に影響を及ぼしうる要因は、宿主植物や根粒の齢、生育環境条件、窒素固定活性

の測定方法、短期的な測定を行う際の時間帯や季節、活性速度の表現方法など、さまざまである。そのためニトロゲナーゼ活性の推定、さらには、窒素固定量の評価には、多くの仮定が必要となる。本研究の窒素固定量の推定もいくつかの主な仮定の基になされていることを認識する必要がある。本研究では、結果に幅を持たせる意味で、2種類の換算比による結果を示した。

微分値を測るアセチレン還元法に対して、攪乱が少なく積分値を測る自然安定同位体法がある (Kurdai et al. 1993; Shearer and Kohl 1993; Wall and Berry 2008)。この方法では、対象の窒素固定樹種と生理的にも根系の深さなどの形態的にも似通った窒素固定を行わない樹種の安定同位体値がコントロールとして必要である。また、土壌の安定同位体比の値が大気と異なることが必要である。これらの点が自然安定同位体法を利用する際の制限要因となる場合があるが、窒素吸収量に占める窒素固定量の寄与率の推定などに有効な手法である (Hurd et al. 2001)。本研究でも自然安定同位体法の併用を試みるため、ケヤマハンノキの葉の自然安定同位体を分析した。しかし、林床の更新木の種類の制限と樹高の低さなどの理由から、適当な同位体比のコントロールの値を取得することができず、自然安定同位体法による評価を行うことはできなかった。

5. 1. 6 植生遷移への寄与

植物群集の形成や生態系機能に影響する窒素固定の役目は大きい (Chapin et al. 1994; Thomas and Bowman 1998)。植物群集の発達中に窒素固定を通じて土壌中の窒素量が増加することにより、遷移後期の種の侵入が誘導・促進され、遷移の進む速さも促進される (Thomas and Bowman 1998)。また、ハンノキ属樹種を針葉樹と混交させることにより、土壌の肥沃化に加えて林床植生の多様性を高める効果があることも注目されている (Hanley et al. 2006)。本調査地のケヤマハンノキ林分の林床に出現した更新樹種は、全樹種で解析した場合、更新樹種の分布様式がヤマハンノキの分布と相関関係を示し、ケヤマハンノキの近くに分布する傾向を示した (2. 3 節, 図 2A)。特に、比較的耐陰性が高く、鳥散布型の種子を持つ樹種がケヤマハンノキと同所的な分布を示した。ハンノキ属樹種の人工林ではユーカリやマツの人工林に比べて鳥類の多様性が高く、その原因は土壌の肥沃化に伴い鳥の餌となる土壌動物の量が増加するためと考えられている (Carlson and Dawson 1985)。本研究のケヤマハンノキ林分でも日中に多くの鳥が集まることが観察された (観察のみ)。他の樹種でも報告例があるように (Hatton 1989; Maltez-Mouro et al. 2007) ケヤマハンノキが止まり木として鳥散布種子の種子供給源の役目を演じている可能性が示唆された。この林分の林床で更新した 26 種中 13 種を占める鳥散布型の種子を持つ樹種は、土壌攪乱後にケヤマハンノキの林分が形成された立地で、他

の樹種よりも早く更新する可能性があることが示唆された。現在、ハンノキ属のような窒素固定樹種が、立地条件の改善に加えて生物多様性の観点からも注目されてきた (Hanley et al. 2006)。本研究でも、ケヤマハンノキが下層の更新樹種への寄与を確認することができた。以上の研究結果から、ケヤマハンノキは窒素固定能力による土壌の肥沃化という立地環境の改善に加えて、止まり木としての鳥散布種子の種子供給源としての更新の促進にも貢献していることが示唆された。

5. 2 高 CO₂ に対するケヤマハンノキの光合成・成長反応に及ぼす土壌条件の影響

高 CO₂ 下で樹木の成長量が増加した場合、その成長量を維持するための養分要求量が増大する。その結果、高 CO₂ 下では窒素が徐々に不足し、高 CO₂ 下での樹木の成長量の増加が抑制されると予想されている (Luo et al. 2004)。現時点では、高 CO₂ 下で樹木の成長促進を維持するためには、森林生態系外からの窒素の追加供給が必要と考えられている (Johnson 2006; Reich et al. 2006)。そこで、共生的生物窒素固定能力を持つハンノキ属樹種のような窒素固定樹種の高 CO₂ に対する反応が将来の高 CO₂ 環境での窒素供給という観点から重要視されている (Houghton et al. 2001)。高 CO₂ 下で窒素固定量が増加し、落葉落枝などのリターによる窒素供給量を通じて土壌の窒素供給量を増加させることにより、窒素固定能を持たない他の樹種の高 CO₂ に対する成長反応が改善されることが期待されている (Norby 1987; Hartwig et al. 1996)。窒素固定は土壌中の養分量や土壌の乾燥など光合成活性に影響を及ぼす環境要因によって影響を受けるため (Hungate et al. 2003; Dawson 2008)、高 CO₂ に対する窒素固定樹種の反応の解明には CO₂ 以外の環境要因との複合効果を考慮する必要がある。特に、土壌の養分供給量の影響は、高 CO₂ に対する樹木の反応に関する未解明の部分が残されている問題である (McCarthy et al. 2010)。そこで本研究の後半部分では、高 CO₂ に対するケヤマハンノキの窒素固定の変化を把握するために、土壌養分と土壌水分条件を CO₂ 以外の要因として考慮し、ポット植栽苗を使った 2 つの制御実験を行った。第 3 章では高 CO₂ と土壌窒素供給量の複合要因実験 (実験 1)、第 4 章では高 CO₂ と土壌中のリン酸供給量の不足と土壌乾燥の複合要因実験 (実験 2) を実施した。これら 2 つの実験結果から、CO₂ 濃度以外の生育環境の資源量制限により、高 CO₂ 環境下におけるケヤマハンノキの窒素固定量の増加が抑制される場合があることが示唆された。5. 2 節では、高 CO₂ に対するケヤマハンノキの生理的反応、形態的反応に及ぼす土壌養分 (窒素供給量とリン酸供給量) と土壌乾燥の影響について、実施した 2 つの CO₂ 付加実験の結果を用いて総合

的な評価を行った。

実験 1 と実験 2 には、同じ処理と見なすことができる処理区が設定されている (3 章, 4 章)。実験 1 の Low-N と、実験 2 の High-P/Wet 処理区である。実験 2 の窒素供給量は実験 1 の Low-N と同じレベルに設定したこと、実験 1 のリン酸供給量は実験 2 の High-P と同じレベルに設定し、実験 2 の水分条件も水を充分与えていることから実験 2 の Wet に相当すると考えられる。これらの処理区内の通常 CO₂ の処理を各実験のコントロールとして、各実験で得られたパラメータについて、コントロールの値に対する変動割合を一つのグラフ上で示すにより処理の効果を評価した (図 1-4)。総合考察において新たなパラメータの結果を加えて示した。両実験の、気孔コンダクタンス ($g_{sw-growth}$)、樹木個体の窒素含量 (total N mass)、窒素含量の地上部・地下部比 (T / R (N) ratio) を追加した。また、実験 2 では最大電子伝達速度 (J_{max})、地上部・地下部比 (T / R ratio)、葉の単位面積あたりの重量 (LMA)、葉の単位面積あたりの窒素含量 (N_{area})、葉の可溶性糖類濃度 (soluble sugar) とデンプン濃度 (starch) とその合計の非構造性炭水化物含量 (TNC) を追加した。また両実験について樹木個体重量と窒素含量間の関係について解析結果を加えた。コントロールに対する各処理区の値の変動幅は、各処理の平均値を用いて算出した。

以下の 3 点に着目して総合考察を行った。1. 高 CO₂ に対するケヤマハンノキの成長反応は、生理的特性 (光合成速度) と形態的特性 (バイオマス配分) の両方に影響を受ける。2. ケヤマハンノキのリン酸要求度は、高 CO₂ 下で増加する傾向を示す。3. 高 CO₂ に対する樹体内の窒素配分は、バイオマス配分の反応と異なる。

5. 2. 1 リン酸供給量が充分ある土壤での光合成反応

高 CO₂ に対する樹木の光合成の順化は葉の窒素含量の低下や葉内の窒素配分の変化と関連している (Ceulemans and Mousseau 1994; Ceulemans et al. 1999; Medlyn 1999; Norby 1999; Temperton 2003)。理論的な光合成の生化学モデル (Farquhar et al. 1980) に基づく最も効率的な窒素配分 (最適窒素配分と呼ぶ) では、CO₂ が 2 倍に上昇するような場合、ルビスコへの配分を減らし、電子伝達に関連する酵素 (Rogers 1999; Harrison 2001) に窒素を配分するほうが有利と考えられ、 $A - C_i$ 関係において最大炭酸同化速度 (V_{cmax}) が低下し、最大電子伝達速度 (J_{max}) が上昇することが予想される (Drake et al. 1997; Makino et al. 1997; Hikosaka and Hirose 1998; Long et al. 2004)。本研究では、土壤のリン酸供給量が充分ある場合、高 CO₂ に対するケヤマハンノキの J_{max} の変化は V_{cmax} に比べて小さく、 J_{max} / V_{cmax} 比が高 CO₂ 下で上昇し、高 CO₂ 下での光合成速度 (生育環境の CO₂ で測定した値; $A_{sat-growth}$) は上昇

した (図 1a, b, c; 3. 2節, 図 1, 4, 5; 第 4 章, 図 6, 7)。3. 2節の考察で記載したように、ヘキソース循環 (Hexose-cycling) と呼ばれる高 CO_2 に対する光合成反応の概念では、葉内の炭水化物の蓄積により生じるシグナルによりルビスコの選択的な減少が生じる (Moore et al. 1999)。このモデルでは、高 CO_2 下でルビスコの選択的な減少により $J_{\text{max}} / V_{\text{cmax}}$ 比が上昇し、生育環境 CO_2 で測定した光合成速度の低下は生じない (Long et al. 2004)。Long et al. (2004) は、 V_{cmax} が低下しても生育環境での光飽和光合成速度が低下しなければ、ダウンレギュレーションの反応というより、順化 (acclimation) と呼ぶと指摘している。本研究で示したケヤマハンノキのリン酸供給量が充分ある場合の高 CO_2 に対する光合成応答は、光合成のダウンレギュレーションというよりは光合成の順化と見なすことができるかもしれない。貧栄養土壌でのハンノキ属樹種の光合成反応 ($A - C_i$ 関係) が高 CO_2 下で変化しなかったという研究例はあるが (Vogel and Curtis 1995; Eguchi et al. 2008)、いずれも高 CO_2 下での V_{cmax} の低下も示しておらず、本研究で示されたような V_{cmax} と J_{max} の変化から見られる最適窒素配分に近い反応は示唆されていない点で異なっている。本研究と、養分条件や CO_2 条件、実験方法 (OTC や mini-FACE) が同じではない点が影響しているのかもしれない。今回みられた窒素固定樹種のケヤマハンノキの高 CO_2 に対する光合成反応は、ケヤマハンノキが窒素固定能をもち土壌中の窒素供給量に光合成活性の反応が左右されないこと、さらには窒素固定能によりシンク能が他の樹種より高くシンクリミットが生じなかった可能性があることが影響した種特異的な反応であることが推察される。ただし、 V_{cmax} の低下はルビスコ量の低下だけでなく、ルビスコ活性の低下を示す場合もあることを認識しておく必要がある。窒素不足の場合に高 CO_2 下でルビスコを生成する遺伝子が減少する (Van Oosten 1995) という報告がある一方で、ルビスコの量は変化しなくても、不活性化した形態のものが増加すること (Woodrow 1994) がある。

5. 2. 2 窒素固定能を持たない樹種の光合成反応

窒素固定能を持たない樹種は、窒素供給量不足の条件下では、高 CO_2 により光合成のダウンレギュレーションを生じる場合が多く (Ainworth and Roger 2007)、高 CO_2 に対して今回ケヤマハンノキが示したような光合成反応を示すことは少ない。高 CO_2 下で光合成のダウンレギュレーションが生じる原因の一つに、光合成生産物の量 (ソース) に対して消費する場所 (シンク) が不足し、葉内に余剰の炭水化物が蓄積することが挙げられる (Stitt and Krapp 1999; Long et al. 2004; Ainsworth and Long 2005; Ainsworth and Rogers 2007)。葉の発達段階などは、シンク・ソースバランスを通じて、高 CO_2 に対する光合成の順化反応に影響を及ぼす (Nie et al. 1995a, 1995b; Reekie 1996; Miller 1997;

Osborne 1998; Wait et al. 1999; Adam 2000; Kander et al. 2000, Lewis et al. 2002, Bernacchi et al. 2005, Davey et al. 2006, Rogers and Ainsworth 2006)。葉の発達段階と関連の深い樹種間の開葉様式の違い (Kikuzawa 1983) もシンク・ソースバランスを左右し、高 CO_2 に対する光合成反応に影響を及ぼすことが予想される。

第3章で示した本研究の実験1のケヤマハンノキとミズナラ、イタヤカエデの樹種間比較の結果から、高 CO_2 に対する光合成反応が、1. 葉齢により異なること、2. 変化の時期や程度が3樹種間で異なること、3. 高 CO_2 に対する各樹種の成長反応に反映されることが示唆された(3.2節)。イタヤカエデやミズナラの高齢葉では、高 CO_2 下で光合成能力が顕著に低下した(3.2節, 図2, 4, 5)。ケヤマハンノキと異なり、高 CO_2 下で V_{cmax} と J_{max} ともに低下し、 $J_{\text{max}} / V_{\text{cmax}}$ 比は変化しなかったため、光合成系内での窒素配分の変化は生じなかったことが示唆された。高 CO_2 に対する光合成応答のもう一つの概念に、葉の窒素含量の非選択的減少 (Jacob 1995; Makino 1997; Sicher 1997; Curtis 2000) と呼ばれ、植物体内の窒素の再配分や、窒素不足の植物で葉の老化が早くなることで葉のタンパク全体が減少し、その結果ルビスコも減少するという反応がある。この反応では $J_{\text{max}} / V_{\text{cmax}}$ 比は変化しないため、ミズナラとイタヤカエデは非選択的減少の概念に近い反応を示したと推察される。本研究の結果から、光合成特性の高 CO_2 に対する応答が、開葉様式や樹種特性に関連している可能性が示唆された。また、この光合成反応の違いが、成長反応にも反映されること(図3a; 3.2節, 表6)、さらに、窒素再吸収効率への影響を通じて落葉の性質の高 CO_2 応答にも影響を及ぼすこと(3.3節, 図2, 4) が示唆された。

5. 2. 3 リン酸供給量が不足する土壌での光合成反応

窒素固定能を持つ樹種は、窒素固定のためのエネルギー要求度が高いため (Uliassi and Ruess 2002; Dawson 2008)、他の窒素固定能を持たない樹種に比べて潜在的なリン酸要求度が高く (Ingestad 1981)、リン施肥に対する反応が大きい (Uliassi et al. 2000)。本研究の第4章で示した実験2で、ケヤマハンノキが、リン酸供給量不足の土壌では、特に、湿潤条件 (Wet) で、高 CO_2 に対して V_{cmax} の低下に加えて J_{max} の低下も生じ、生育環境 CO_2 で測定した光合成速度も上昇しなかった(図1 a-c; 第4章, 図6)。以上のリン酸供給量不足に対するケヤマハンノキの光合成反応は、高 CO_2 下での明らかな光合成のダウンレギュレーションを示唆する。シンク能の減少や不足は、窒素供給量の不足や発達速度の低下など、多くの過程の結果として生じ (Rogers and Ainsworth 2006)、炭水化物由来のシグナルの発現につながり、このシグナルにより、光合成機能のダウンレギュレーションが引き起こされると

考えられている (Long et al. 2004; Ainthworth and Rogers 2007)。リン酸供給量不足の土壤中、葉の TNC (非構造的炭水化物)、その中でも可溶性糖類の蓄積が通常 CO_2 濃度条件で生じていた (図 2b, 表 2)。リン酸供給量が多いときに比べて相対的にシンクリミットになっていることが示唆される。また、単位面積あたりの葉の窒素含量も通常 CO_2 濃度条件で低下していた (図 2a)。リン酸不足により根粒形成の抑制や成長量の抑制が生じ (Wall and Berry 2008)、窒素固定能力が制限されたことが理由として考えられる。実験 2 は窒素供給量が少ない状態で実施しているため、窒素固定能力の抑制により相対的な窒素リミットが生じた可能性も考えられる。これらの結果から、リン酸供給量不足の環境では通常 CO_2 濃度の状態でも、窒素固定能力の低下と光合成能力の低下の間にフィードバックが生じ、窒素リミットとシンクリミットの両方が解除されず、シンク・ソースバランスが崩れていたことが示唆された。このようなリン酸供給量不足での葉の性質の変化に伴う光合成機能の低下と、LAR の低下や T / R 比の低下という形態的な変化 (図 3b, c) の両方が影響して、リン酸供給量不足の条件下で、ケヤマハンノキの成長が抑制され、高 CO_2 による成長促進効果が検出されなかったことが示唆された。

5. 2. 4 リン酸供給量が不足する土壤中の水分条件の影響

高 CO_2 下での乾燥土壤に対する光合成の順化反応 (V_{cmax} の上昇) はこれまでにシラカンバ (Kitao et al. 2007) や草本種 (Qaderi et al. 2006) で報告されている。乾燥土壤に対する光合成の順化反応における V_{cmax} の上昇が、多くの植物でみられる高 CO_2 に対する光合成のダウンレギュレーション (Long et al. 2004 など) における V_{cmax} の低下と逆向きの反応であるため、乾燥土壤では、高 CO_2 による光合成反応 (ダウンレギュレーション) が緩和されることが示唆されている (Qaderi et al. 2006; Kitao et al. 2007)。しかし、乾燥に対する光合成の順化反応が、樹種や養分条件に関わらず生じるのかどうかは明らかになっていない。特に、土壤水分条件と養分条件の複合効果に対する樹木の反応に対する知見は不足している (Lewis et al. 2010)。本研究では、ケヤマハンノキの V_{cmax} は、リン酸供給量が多い場合、 CO_2 処理に関わらず湿潤土壤よりも乾燥土壤のほうが高かった (図 1a; 第 4 章, 図 6)。この結果は、ケヤマハンノキが乾燥土壤に対して光合成の順化反応 (V_{cmax} の上昇) を示したと考えられる (第 4 章)。この光合成反応を反映して、リン酸供給量が充分ある場合、乾燥土壤でも CO_2 上昇によりケヤマハンノキの成長量が促進されることが明らかになった (図 3a; 第 4 章, 図 3)。

一方、リン酸供給量不足の土壤では、土壤の水分条件に関わらず、高 CO_2 下でケヤマハンノキの成長量が促進されることはなかった (図 3a; 第 4 章, 図 3)。リン酸供給量不足の場合、高 CO_2 では

湿潤土壌に比べて乾燥土壌で V_{cmax} が高かったが、通常 CO_2 では土壌水分処理間で V_{cmax} が変化しなかった。リン酸供給量が不足する土壌の湿潤条件では、生育環境 CO_2 での光合成速度に明瞭な正の効果が見られず、高 CO_2 下での光合成のダウンレギュレーションが最も顕著に見られた (図 1 a, c; 第 4 章, 図 6, 7)。葉がストレスを受けていない場合、夜明け前の F_v/F_m (光化学系 II の最大光量子収率; Krause 1994) は 0.8 - 0.83 を示し、 F_v/F_m の低下は光障害の程度を表す指標として利用されている。実験 2 では、夏の晴天日の F_v/F_m が、Low-P - Wet の高 CO_2 処理区で、夜明け前の値 (約 0.7) と日中の値 (約 0.4) が最も低かった (Tobita et al. 2008)。これらの結果から、高 CO_2 下では、リン酸供給量不足の湿潤条件 (Low-P - Wet) の土壌で、葉が日中に受ける強光ストレスが最も強くなる可能性が示唆された。以上の結果から、リン酸供給量不足の土壌で、高 CO_2 では湿潤土壌に比べて乾燥土壌で V_{cmax} が高かったことは、乾燥で V_{cmax} が上昇したという乾燥土壌に対する順化反応というより、湿潤土壌で V_{cmax} が低下したと解釈することが妥当と考えた。

同じ処理を施したハンノキ属 (ミヤマハンノキ亜属) のミヤマハンノキでは、土壌中のリン酸供給量に関わらず乾燥土壌での V_{cmax} の上昇が見られず、乾燥条件に対する光合成の順化反応を示さなかった (第 4 章, 図 6)。同じハンノキ属内の樹種間でも、乾燥土壌に対する光合成反応の違いがあることが示唆された。

5. 2. 5 高 CO_2 環境でのリン酸要求量

樹木の養分要求度は、生育環境により変動し、高 CO_2 下でリン酸要求度が上昇することがヤマナラシ属の *Populus deltoides* (Lewis et al. 2010) やアカマツ (Kogawara et al. 2006) で示唆されている。リン酸供給量の処理間のケヤマハンノキ個体重量の変動幅は、通常 CO_2 より高 CO_2 のほうが大きい傾向を示した (図 2a)。この結果から、ケヤマハンノキのリン酸要求度が高 CO_2 下で上昇することが示唆された。この高 CO_2 下でリン酸要求度が上昇する反応は、乾燥土壌でも同様に見られた。高 CO_2 によりリン酸要求度が高まるという示唆は、多くの生態系で高 CO_2 に対して窒素要求度が高くなり、窒素制限が生じる可能性があるという指摘 (Reich et al. 2006) と似ている。今回の実験結果は、Lewis et al. (2010) が考察しているように、 CO_2 上昇に伴い成長速度が増加し、その増加した成長量を支持するためにリン酸要求度が上昇するという現象が、将来の CO_2 に対する植物の反応を制限する窒素と別の要因となる可能性があることを示唆する。特に、窒素固定樹種については、窒素固定能を持たない樹種に比べて通常 CO_2 条件下でのリン酸要求度が高いため (Ingestad 1981)、リン酸供給量が高 CO_2 に対する光合成や成長における反応を制限する要因になりやすい可能性がある。

5. 2. 6 高 CO₂ 環境での相対成長関係

高 CO₂ に対する樹木の成長反応は、成長速度への影響を通じて生じるか、もしくは、成長速度に依存しないバイオマス配分の変化により生じる (Lewis et al. 2010)。ケヤマハンノキの各器官の重量と個体重量の相対成長関係には、根粒重量、直径 2 mm 以上の太根の重量、葉面積、以外では高 CO₂ による顕著な変化がみられなかった (表 4)。これらの結果から、樹体内のバイオマス配分様式の処理間差は、バイオマス配分様式の変化というよりも、主に、処理間の樹木個体サイズの違い、つまり成長速度の違いにより生じたことが示唆された。本研究のケヤマハンノキの結果では、相対成長関係に対する高 CO₂ の効果が少なかったが、Lewis et al. (2010) は、ヤマナラシ属の *Populus deltoides* について樹木個体重量と各器官の間の相対成長関係が高 CO₂ で変化したことを示した。高 CO₂ に対するバイオマス配分の反応には種特異的な反応がある可能性が示唆された。一方、リン酸不足や土壌乾燥によるバイオマス配分の変化幅が大きく、高 CO₂ より影響が大きいことが示唆された (図 3, 表 3)。

土壌の乾燥に対する反応と同様に、高 CO₂ に対する反応として根のバイオマス配分の増加 (T/R 比の低下) が多数報告されている (Edwards et al. 2006; Erice et al. 2007; Xu et al. 2007)。しかし、本研究のケヤマハンノキの結果では、通常 CO₂ の High-P - 乾燥土壌で比較的高い T / R 比と葉面積比 (LAR) を示した (図 3b, c)。リン酸供給量が充分ある場合、乾燥土壌に対して高い T/R 比と LAR を示した理由を考える。ケヤマハンノキの葉の N / P 比は、土壌乾燥 / High-P / 通常 CO₂ の処理区の値が全処理区の中で最も低かった (約 12, 第 4 章, 表 1)。N / P 比などの養分比は最適養分状況や、ある養分の不足状況を知るために利用される (Gentili and Huss-Danell 2003; Bown et al. 2007)。葉の N / P 比が低いことは、他の処理に比べてリン制限が比較的少ないことを意味する。リン酸供給量が多い場合、一般的に、葉へのバイオマス配分が根へのバイオマス配分に比べて増加する。これらの現象は LAR や T / R 比の増加につながるだろう。しかし、これらの土壌乾燥に対する反応はリン酸不足ではみられなかった。以上の結果は、ケヤマハンノキでは、土壌乾燥条件よりもリン酸不足のほうが、LAR や T / R 比のようなバイオマス配分に対する影響が大きいことを示唆する。

5. 2. 7 高 CO₂ 環境での根粒形成

高 CO₂ 下で根粒重量が増加することが多数報告されている (Tjepkema et al. 1986; Norby 1987; Hibbs et al. 1995; Koike et al. 1997) が、根粒へのバイオマス配分の増加と樹体バイオマスの増加に伴った根

粒バイオマスの増加との間で統一した見解は示されていない。本研究では、ケヤマハンノキの個体バイオマスと根粒バイオマスの関係は高 CO₂ の影響を受けなかった (図 3 d; 3. 1 節, 図 2; 第 4 章, 図 4)。この結果から、実験 1 と実験 2 のリン酸供給量が多い土壌でみられた、高 CO₂ 下での樹木個体あたりの根粒バイオマスの増加は、根粒へのバイオマス配分比の増加ではなく、樹木個体の成長量の増加が原因であることが示唆された (3. 1 節; 第 4 章)。

土壌中の窒素供給量が多い場合、根粒形成を抑制し土壌中の窒素の吸収割合を増加させる宿主樹木側の仕組みが働く (Wall and Berry 2008)。その理由は窒素固定には宿主からの炭水化物供給のコストがかかり、例えば実験室レベルでは総生産量 (GPP) の約 25% に相当するエネルギーが必要となるためである (Lamber et al. 1998)。この量は、土壌中の窒素を吸収するために必要なエネルギーの 2 から 4 倍の値に相当する。高 CO₂ 環境下では光合成の基質となる CO₂ 濃度が高いため、光合成速度が高まり、根粒への光合成生産物の配分が増加し (Norby 1987 ; Vogel et al. 1997)、土壌の窒素供給量の増加に伴う根粒の形成や活性の抑制が緩和される可能性が考えられる (Thomas et al. 2000)。しかし、実験 1 では樹体バイオマスに対する根粒バイオマスの相対成長関係の傾きが Low-N より High-N で低下し、窒素供給量が多い場合に宿主樹木による根粒形成の抑制効果が高 CO₂ でも生じることが明らかになった (図 3 d; 3. 1 節, 図 1 B)。高 CO₂ 下で窒素固定樹種が吸収した窒素に占める窒素固定由来の窒素の占める割合が高い期間が現状より長く継続し、窒素固定による生態系への窒素収入量が増加することが期待されたが、今回の結果からは支持されなかった。

実験 1 では、High-N での根粒へのバイオマス配分比 (NMR) の低下に伴い、CO₂ 処理に関わらず光合成速度が上昇した。土壌窒素供給量が多い場合、窒素固定に比べてエネルギー消費の少ない土壌中の窒素を利用することができるため、根粒形成や窒素固定能力を調節するプロセス (Wall and Berry 2008) が作用して、根粒形成や維持のコストが軽減され、葉の窒素含量と光合成能力が上昇することが示唆された。

実験 2 では、CO₂ 処理に関わらず、樹体バイオマスに対する根粒バイオマスの相対成長関係の傾きが湿潤土壌に比べて乾燥土壌で増加する傾向を示した (第 4 章, 図 4)。根粒形成は土壌中の無機態窒素供給量と同様、外部のリン酸供給量に影響を受ける (Gentili and Huss-Danell 2003; Edwards et al. 2006)。先述したように (5. 2. 7)、ケヤマハンノキの葉の N / P 比は土壌乾燥 / High-P / 通常 CO₂ で最も低く (約 12, 第 4 章, 表 1)、他の処理に比べてリン制限が比較的少ないことが示唆された。土壌のリン酸供給量が多いことが、乾燥土壌で根粒バイオマスの割合が増加する現象を引き起こしているのかもしれない。ただし、同じハンノキ属樹種でも、ミヤマハンノキでは乾燥土壌で根

粒バイオマス配分が増加するという現象は不明瞭だった（第 4 章, 図 4）。CO₂ 処理に関わらず、乾燥土壌での成熟葉の窒素濃度の上昇と光合成能力 (V_{\max}) の上昇はケヤマハンノキのみが示し、ミヤマハンノキでは乾燥土壌に対する光合成の順化反応は見られなかった（第 4 章, 表 1, 図 6）。このような乾燥土壌に対する光合成の順化反応の樹種間差が、ケヤマハンノキの根粒へのバイオマス配分の増加に寄与している可能性も推察された。

5. 2. 8 高 CO₂ 環境での窒素固定量

窒素固定樹種の窒素固定速度は、根粒バイオマスの変化または根粒のニトロゲナーゼ活性の変化により生育環境条件に対して順応する (Valverde et al. 2002)。ハンノキ属樹種の研究例では高 CO₂ 下で樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが示されているが、その理由として、根粒のニトロゲナーゼ活性の上昇 (Temperton et al. 2003)、根粒バイオマスの増加 (Hibbs et al. 1995)、その両方 (Norby 1987; Arnone and Gordon 1990; Vogel et al. 1997) と様々な結果が報告されており、統一した見解は示されていない。本研究の 2 つの実験では、根粒のニトロゲナーゼ活性の上昇ではなく、高 CO₂ 下での樹木の成長促進に伴う根粒バイオマスの増加が原因で樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが示唆された（3. 1 節; 第 4 章）。

実験 1 では、窒素を与えなかった N-free 区において高 CO₂ 下でケヤマハンノキの窒素吸収量が増加する傾向を示し（3. 1 節, 表 2）、根粒のニトロゲナーゼ活性（計算から推定した単位根粒重量当たりの窒素固定速度；specific nitrogenase activity (SNA)）の推定値は高 CO₂ 下で上昇しなかった。根粒のニトロゲナーゼ活性を実測していないが、高 CO₂ 下でも吸収する窒素の中で窒素固定由来の窒素の占める割合は通常 CO₂ の場合と変わらないという報告例があり (Vogel et al. 1997; Schortemeyer et al. 1999)、実験 1 の High-N と Low-N の処理において樹木個体の総窒素含量が高 CO₂ 下で増加したこと（図 4a; 3. 1 節, 表 2）から、High-N と Low-N の条件下でも N-free と同様に高 CO₂ 下でケヤマハンノキの個体あたりの窒素固定量が増加したことが推察された。

窒素固定の過程においてリンを必要とするため、窒素固定樹種は窒素固定能を持たない樹種に比べて潜在的なリン要求度が高く (Ingstad 1981; Huss-Danell 1990; Uliassi and Ruesch 2002; Dawson 2008)、リン施肥に対する反応が大きい (Israel 1987; Reddell et al. 1988)。ハンノキ属樹種の成長量はリン施肥により増加することが報告されているが、根粒のニトロゲナーゼ活性はリン施肥により変化しないか変化が少ない場合 (Ekblad and Huss-Danell 1995; Uliassi et al. 2000; Uliassi nad Ruesch 2002) と顕著に上昇する場合 (Russo 1989; Fraga-Beddiar and Le Tacon 1990) が示されている。本研究の実験 2 では高

CO₂ に対する窒素固定の反応は土壌中のリン酸供給量に大きく依存していた。リン酸供給量が充分ある土壌では、根粒のニトロゲナーゼ活性の上昇ではなく（第 4 章, 図 1）、樹体バイオマスの増加（図 3a; 第 4 章, 図 3）に伴う樹木個体あたりの根粒バイオマスの増加（第 4 章, 図 2）により高 CO₂ 下で樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが示唆された。同様の反応は土壌水分条件にかかわらず、乾燥土壌条件でもみられることが明らかになった。土壌乾燥条件下でも高 CO₂ 下で成長量が増加したという草本種での報告例がある (Erice et al. 2007)。ケヤマハンノキもリン酸供給量が充分ある場合、乾燥土壌下でも高 CO₂ 下で樹木個体の成長量が促進され窒素固定量が増加することが示唆された。一方、リン酸供給量が不足する土壌では、土壌水分条件によらず根粒のニトロゲナーゼ活性の低下ではなく、樹木個体の成長が大幅に抑制された結果、根粒バイオマスが増加しなかった（第 4 章, 図 1, 2）。リン酸供給量が不足する土壌では、樹木個体あたりの窒素固定量が高 CO₂ 下で増加しないことが示唆された（図 2, 3）。以上の実験 2 でケヤマハンノキが示した反応は、同じハンノキ属の別の亜属のミヤマハンノキでも同様にみられた（第 4 章）。今回の実験では、高 CO₂ 条件下でも樹木個体あたりの根粒バイオマスがリン酸供給量不足の影響を受けることが明らかとなり、高 CO₂ 下でもハンノキ属樹種の樹木個体あたりの窒素固定量の増加のためには、リン酸供給が必要であることが示唆された。

5. 2. 9 樹体内の窒素配分とバイオマス配分の高 CO₂ 応答

樹木の成長に対する高 CO₂ や、土壌リン酸供給量不足、土壌乾燥のそれぞれの単一要因の影響は研究例があるが、バイオマス配分や窒素配分に対するこれらの環境要因の交互効果については理解が不十分である (Xu et al. 2007)。特に、窒素固定樹種では、高 CO₂ に対する成長量の反応と併せて、樹体内の窒素蓄積量の変化が注目されているため、樹体内バイオマス配分だけでなく樹体内窒素配分の反応を明らかにすることが必要と考える。樹体内の窒素配分は、樹体内バイオマス配分の反応に加えて各器官の窒素濃度の変化を反映する。コントロールに対する各処理区の値の変動幅は、バイオマス配分よりも窒素配分のほうが大きかった。例えばバイオマスでの T / R 比の変動幅に比べて窒素量の T / R 比の変動幅のほうが大きかった（図 3b, 4b）。これらの結果は、特に乾燥土壌において、個体全体の窒素濃度の低下 (ANOVA; $P = 0.006$)、葉の窒素濃度の低下 (ANOVA; $P = 0.01$)、根の窒素濃度の不変というように、処理に対する窒素濃度の反応が器官により異なったことを反映していた（データは示していない）。特に、実験 2 の樹木個体全体の窒素含量と葉の窒素含量は、同じ樹体バイオマスで比較した場合、通常 CO₂ に比べて高 CO₂ で低下傾向を示した（表 4）。その結果、

高 CO₂ 下での樹木個体内の窒素量の増加は、高 CO₂ に対する樹木個体重量の反応から予測されるよりも少なかった (図 3a, 4a)。Xu et al. (2007) は、砂漠に生育する低木のマメ科 *Caragana intermedia* について、高 CO₂ により葉への窒素配分が有意に減少し、根への窒素配分が増加したことを報告している。今回の樹体バイオマスと窒素含量の関係の結果は、高 CO₂ 下で、ハンノキ樹種の窒素固定能力を考慮する場合、バイオマス量だけでなく、窒素配分の評価が必要であることを示唆する。

5. 2. 10 落葉の窒素含有量に対する高 CO₂ の影響

落葉の窒素濃度に代表される化学性や分解速度に対する高 CO₂ の影響に関する統一的な見解はまだ得られていない (Vogel et al. 1997; Vizo et al. 2008)。また、落葉の化学性を制御する葉の老化時の養分再吸収効率に対する高 CO₂ の影響に関する知識も不足している (Norby et al. 2001; Norby and Iversen 2006)。本研究の実験 1 の結果は、Strain and Bazzaz (1983) の高 CO₂ 下での成熟葉の窒素濃度 (単位葉重量あたりの窒素含量) の低下により落葉の窒素濃度も低下し分解速度が低下するという概念 (Litter quality hypothesis) に対して積極的に支持する結果は得られなかった (3. 3 節)。落葉時の窒素再吸収効率は、面積あたりで評価した場合でもケヤマハンノキの High-N を除いて高 CO₂ で低下する傾向を示した。これは Arp (1991) の結果と一致した。葉内の可溶性窒素と構造的窒素の比は窒素の再吸収を制御する重要な要因と考えられ (Pugnaire and Chapin 1993)、CO₂ 上昇により葉内の可溶性窒素と構造的窒素の比が変化することで窒素再吸収効率に影響を及ぼす可能性がある (Arp 1991; Norby et al. 1999)。落葉時の窒素再吸収効率や、再吸収される生葉窒素の画分には樹種間で大きな差がある (Chapin and Kedrowski 1983) ため比較は難しいが、落葉の窒素濃度や落葉時の窒素再吸収効率に対する高 CO₂ の影響は遷移段階の位置により樹種間で異なる可能性が示唆された。ただし、Norby et al. (2001) が指摘しているように、実験設定に関して、人為的な誤差がある可能性も認識する必要がある。

5. 2. 11 高 CO₂ 応答のまとめ

土壌リン酸供給量は光合成とバイオマス配分への影響を通じて高 CO₂ に対するケヤマハンノキの成長反応に影響を及ぼした。ケヤマハンノキの成長反応のリン酸供給量に対する感受性は、高 CO₂ で通常 CO₂ より増加し、高 CO₂ 下でのリン酸要求量の増加が示唆された。ケヤマハンノキのバイオマスの相対成長関係はいくつかの例外を除いて高 CO₂ 下で変化がなかった。これらの結果から、高 CO₂ 下でみられたバイオマス配分の変化は主に処理間の個体サイズの変化 (成長速度の違い) によるも

のであることが示唆された。ケヤマハンノキの樹体内の窒素配分の高 CO_2 に対する反応は、バイオマス配分の高 CO_2 に対する反応と異なった。これらの結果から、ハンノキ属樹種の高 CO_2 に対する窒素固定能力の反応を調べる場合、バイオマス蓄積のみではなく樹体内窒素量配分を評価することが必要であることが示唆された。

ケヤマハンノキの窒素固定により樹体内に吸収された窒素は、主に落葉を通じて土壤に供給される。成熟葉の窒素濃度は高 CO_2 下で低下したが、落葉時の窒素再吸収効率が高 CO_2 下で低下する傾向を示した。高 CO_2 下での樹木個体の成長量の増加に伴い個体あたりの葉面積が増加したため、落葉中に含まれる窒素含量が高 CO_2 下で増加した。つまり、高 CO_2 下で樹木個体あたりの窒素固定量が増加したことを反映して、落葉を通じて土壤に供給される窒素量も高 CO_2 下で増加することが示唆された。同様の反応は窒素供給量が不足する場合でも同様に見られた。以上の結果より、ポット苗を用いた実験結果であるが、窒素不足の立地においても、高 CO_2 下でケヤマハンノキの成長が促進され、窒素固定量の増加により落葉を通じての土壤への窒素供給量が増加し、他樹種の高 CO_2 に対する成長反応を促進させる役割を担うことが期待される。ただし、高 CO_2 下で落葉の単位重量あたりの窒素含量が低下し、C / N 比が上昇したことから、落葉の分解速度が通常大気に比べて遅くなる可能性も考えられたが、分解速度に関しては未解明のまま残った。

表 1 ケヤマハンノキの各処理における最大炭酸固定速度 (V_{cmax} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、最大電子伝達速度 (J_{max} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、光飽和光合成速度 ($A_{\text{sat-growth}}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、気孔コンダクタンス ($g_{\text{sw-growth}}$, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)。実験 I (Exp-I) の $[\text{CO}_2]$ と窒素処理 (N)、実験 II (Exp-II) の $[\text{CO}_2]$ とリン酸処理 (P) と土壤水分処理 (Water) に対して、それぞれ行った分散分析の結果 (F 値, P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)

		V_{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	J_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$A_{\text{sat-growth}}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$g_{\text{sw-growth}}$ ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Exp. I					
Low-N	Ambient CO_2 - Wet	60.2 ± 3.01	78.5 ± 4.40	12.8 ± 0.62	0.56 ± 0.03
Low-N	Elevated CO_2 - Wet	47.0 ± 2.55	71.1 ± 4.33	14.3 ± 0.89	0.45 ± 0.02
High-N	Ambient CO_2 - Wet	65.8 ± 1.64	84.2 ± 3.41	13.8 ± 0.32	0.63 ± 0.06
High-N	Elevated CO_2 - Wet	55.5 ± 1.64	78.0 ± 3.71	16.7 ± 0.74	0.44 ± 0.07
	Source of variance	F	P	F	P
	CO_2	7.0	0.118	0.9	n.s.
	N	13.6	0.002	0.4	0.080
	N x CO_2	0.6	n.s.	0.028	n.s.
Exp. II					
High-P	Ambient CO_2 - Wet	51.2 ± 2.73	80.8 ± 4.99	11.4 ± 0.81	0.30 ± 0.05
High-P	Elevated CO_2 - Wet	40.7 ± 2.30	77.5 ± 5.25	14.2 ± 0.83	0.20 ± 0.03
Low-P	Ambient CO_2 - Wet	37.8 ± 3.90	66.6 ± 6.45	8.4 ± 0.91	0.27 ± 0.02
Low-P	Elevated CO_2 - Wet	23.7 ± 2.22	46.2 ± 4.15	8.0 ± 0.80	0.18 ± 0.02
High-P	Ambient CO_2 - Dry	56.6 ± 2.64	83.5 ± 6.46	9.8 ± 0.32	0.14 ± 0.02
High-P	Elevated CO_2 - Dry	48.3 ± 2.06	81.5 ± 3.72	14.3 ± 0.74	0.13 ± 0.02
Low-P	Ambient CO_2 - Dry	34.5 ± 5.92	58.2 ± 8.62	6.3 ± 1.01	0.14 ± 0.01
Low-P	Elevated CO_2 - Dry	28.6 ± 4.60	55.2 ± 6.98	9.3 ± 1.38	0.14 ± 0.02
	Source of variance	F	P	F	P
	CO_2	18.7	0.010	8.8	0.036
	P	36.4	0.003	23.4	0.007
	P x CO_2	0.01	n.s.	0.4	n.s.
	water	3.0	0.153	0.4	n.s.
	water x CO_2	0.05	n.s.	0.03	n.s.
	water x P	3.1	0.088	1.4	n.s.
	water x P x CO_2	1.6	n.s.	1.7	n.s.

表 2 ケヤマハンノキの各処理における単位葉面積あたりの窒素含量 (N_{area} , $g\ m^{-2}$)、非構造化炭水化物 (TNC, %)、デンプンと可溶性糖濃度 (%), 単位重量あたりの窒素含量 (N_{mass} , $mg\ g^{-1}$)、単位葉面積あたりの葉重量 (LMA, $g\ m^{-2}$)。実験 I (Exp-I) の $[CO_2]$ と窒素処理 (N)、実験 II (Exp-II) の $[CO_2]$ とリン酸処理 (P) と土壌水分処理 (Water) に対して、それぞれ行った分散分析の結果 (F 値, P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)

		leaf N ($g\ m^{-2}$)	leaf TNC (%)	leaf starch (%)	leaf soluble sugar (%)	leaf N ($mg\ g^{-1}$)	LMA ($g\ m^{-2}$)
Exp. I							
Low-N	Ambient CO_2 - Wet	1.28 ± 0.05	7.8 ± 1.43	3.6 ± 1.32	4.2 ± 0.17	34.3 ± 0.05	37.6 ± 1.86
Low-N	Elevated CO_2 - Wet	1.12 ± 0.03	10.8 ± 2.13	6.1 ± 1.87	4.7 ± 0.36	27.3 ± 0.03	41.3 ± 1.58
High-N	Ambient CO_2 - Wet	1.33 ± 0.06	7.8 ± 1.18	3.7 ± 0.89	4.0 ± 0.37	36.0 ± 0.06	37.1 ± 1.57
High-N	Elevated CO_2 - Wet	1.21 ± 0.05	11.1 ± 1.48	6.9 ± 1.28	4.2 ± 0.30	30.1 ± 0.05	40.2 ± 1.78
	Source of variance	F	P	F	P	F	P
	CO_2	12.0	0.074	1.2	n.s.	1.3	n.s.
	N	2.3	0.151	0.04	n.s.	0.7	n.s.
	N x CO_2	0.1	n.s.	0.1	n.s.	0.2	n.s.
Exp. II							
High-P	Ambient CO_2 - Wet	1.40 ± 0.065	26.4 ± 1.61	4.7 ± 1.04	21.7 ± 1.03	19.1 ± 0.804	73.4 ± 3.09
High-P	Elevated CO_2 - Wet	1.38 ± 0.048	31.0 ± 2.39	10.1 ± 1.50	20.9 ± 1.37	16.3 ± 0.344	84.5 ± 2.98
Low-P	Ambient CO_2 - Wet	1.27 ± 0.076	29.4 ± 1.83	2.7 ± 1.61	26.7 ± 0.87	16.9 ± 0.894	75.3 ± 3.21
Low-P	Elevated CO_2 - Wet	1.24 ± 0.066	30.4 ± 2.56	5.0 ± 2.40	25.4 ± 1.25	15.5 ± 1.151	80.5 ± 2.43
High-P	Ambient CO_2 - Dry	1.50 ± 0.077	22.0 ± 2.09	2.2 ± 1.19	19.8 ± 1.11	22.2 ± 1.559	68.1 ± 1.78
High-P	Elevated CO_2 - Dry	1.37 ± 0.078	33.0 ± 2.65	11.8 ± 2.67	21.1 ± 1.23	17.3 ± 1.278	79.9 ± 2.33
Low-P	Ambient CO_2 - Dry	1.17 ± 0.063	27.6 ± 1.02	3.1 ± 1.24	24.6 ± 0.95	15.6 ± 0.855	75.6 ± 2.72
Low-P	Elevated CO_2 - Dry	1.09 ± 0.100	30.4 ± 1.20	3.8 ± 0.93	26.6 ± 1.25	13.4 ± 1.100	81.8 ± 3.18
	Source of variance	F	P	F	P	F	P
	CO_2	0.2	n.s.	3.8	0.121	7.2	0.055
	P	12.5	0.018	3.6	0.130	76.7	0.001
	P x CO_2	0.1	n.s.	17.9	0.013	55.2	0.002
	water	1.7	n.s.	8.9	0.039	1.4	n.s.
	water x CO_2	0.1	n.s.	32.3	0.004	1.3	n.s.
	water x P	2.0	0.171	0.01	n.s.	0.02	n.s.
	water x P x CO_2	0.1	n.s.	0.7	n.s.	1.6	n.s.

表 3 ケヤマハンノキの各処理における葉面積比 (LAR, $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)、根粒重量比 (NMR, g g^{-1})、地上部/地下部比 (T/R 比, g g^{-1})、個体重量 (g)、窒素含量に関する地上部/地下部比 (T/R (N) 比, g g^{-1})。実験 I (Exp-I) の $[\text{CO}_2]$ と窒素処理 (N)、実験 II (Exp-II) の $[\text{CO}_2]$ とリン酸処理 (P) と土壤水分処理 (Water) に対して、それぞれ行った分散分析の結果 (F 値, P 値) と、各パラメータに対する各処理の交互効果の結果を示した。n.s. は統計的に有意差がないことを示す ($P > 0.15$)

		LAR ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	NMR (g g^{-1})	T/R ratio (g g^{-1})	Total dry mass (g)	T/R (N) ratio (g g^{-1})	Total N mass (g)						
Exp. I													
Low-N	Ambient CO_2 - Wet	0.0102 ± 0.0005	0.012 ± 0.0009	2.78 ± 0.14	34.3 ± 3.19	4.40 ± 0.29	0.62 ± 0.046						
Low-N	Elevated CO_2 - Wet	0.0100 ± 0.0007	0.010 ± 0.0006	2.98 ± 0.22	40.6 ± 3.05	4.68 ± 0.46	0.73 ± 0.060						
High-N	Ambient CO_2 - Wet	0.0110 ± 0.0005	0.007 ± 0.0005	2.87 ± 0.16	34.5 ± 3.67	4.02 ± 0.36	0.73 ± 0.075						
High-N	Elevated CO_2 - Wet	0.0099 ± 0.0005	0.007 ± 0.0006	2.90 ± 0.11	43.5 ± 5.72	3.86 ± 0.20	0.82 ± 0.089						
Source of variance		F	P	F	P	F	P	F	P				
CO ₂		0.50	n.s.	0.35	n.s.	0.145	n.s.	3.99	0.184	0.01	n.s.	7.11	0.117
N		0.61	n.s.	38.24	0.025	0.001	n.s.	3.28	n.s.	4.12	0.179	13.37	0.067
N x CO ₂		0.81	n.s.	1.44	n.s.	0.273	n.s.	2.52	n.s.	0.54	n.s.	0.06	n.s.
Exp. II													
High-P	Ambient CO_2 - Wet	0.0045 ± 0.0003	0.012 ± 0.0008	1.06 ± 0.053	68.31 ± 3.942	0.46 ± 0.023	0.67 ± 0.019						
High-P	Elevated CO_2 - Wet	0.0040 ± 0.0004	0.012 ± 0.0005	1.15 ± 0.057	83.16 ± 3.956	0.47 ± 0.018	0.77 ± 0.041						
Low-P	Ambient CO_2 - Wet	0.0034 ± 0.0002	0.012 ± 0.0012	0.84 ± 0.043	12.38 ± 0.942	0.63 ± 0.022	0.13 ± 0.012						
Low-P	Elevated CO_2 - Wet	0.0038 ± 0.0004	0.010 ± 0.0011	0.90 ± 0.048	11.27 ± 1.181	0.64 ± 0.019	0.11 ± 0.009						
High-P	Ambient CO_2 - Dry	0.0057 ± 0.0003	0.019 ± 0.0007	1.23 ± 0.040	24.92 ± 1.013	0.41 ± 0.023	0.32 ± 0.019						
High-P	Elevated CO_2 - Dry	0.0044 ± 0.0003	0.018 ± 0.0011	1.09 ± 0.046	35.81 ± 1.275	0.48 ± 0.020	0.37 ± 0.015						
Low-P	Ambient CO_2 - Dry	0.0032 ± 0.0004	0.015 ± 0.0015	0.77 ± 0.064	11.32 ± 0.951	0.67 ± 0.023	0.12 ± 0.017						
Low-P	Elevated CO_2 - Dry	0.0030 ± 0.0004	0.014 ± 0.0015	0.74 ± 0.040	11.21 ± 0.783	0.71 ± 0.018	0.10 ± 0.004						
Source of variance		F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
CO ₂		4.6	0.084	1.6	n.s.	0.3	n.s.	27.1	0.003	3.6	0.126	16.2	0.004
P		29.6	0.003	21.2	0.004	46.4	0.002	416.2	<.0001	97.9	0.000	806.0	<.0001
P x CO ₂		4.9	0.077	4.3	0.086	1.0	n.s.	10.3	0.028	3.2	0.140	9.7	0.027
water		0.5	n.s.	25.8	0.006	0.01	n.s.	164.6	0.000	0.8	n.s.	292.2	<.0001
water x CO ₂		3.34	0.132	0.09	n.s.	6.0	0.065	0.3	n.s.	12.3	0.017	1.3	n.s.
water x P		5.3	0.029	5.5	0.026	5.5	0.027	164.8	<.0001	7.5	0.011	110.9	<.0001
water x P x CO ₂		0.01	n.s.	0.04	n.s.	1.9	0.181	0.5	n.s.	2.3	0.142	0.5	n.s.

表 4 実験 I (Exp-I) の土壌窒素処理 (High-N と Low-N)、実験 II (Exp-II) の土壌水分処理 (土壌の湿潤条件と乾燥条件) について、[CO₂] 処理 (通常 CO₂ と高 CO₂) に関連する根粒重量 (g)、個体総窒素含量 (mg)、葉の窒素含量 (mg) の共分散分析結果。個体重量を共変量として解析した。[CO₂] 処理、土壌窒素処理、土壌水分処理は独立変数として解析した。df, 自由度; SS, 平方根二乗; MS, 平均平方

Source of variance	nodule dry mass (g)					total N (mg)					leaf N (mg)				
	SS	df	MS	F	p > F	SS	df	MS	F	p > F	SS	df	MS	F	p > F
Exp. I															
total dry mass	0.1	1	0.1	30	<0.0001	510318	1	510318	150	<0.0001	156867	1	156867	56	<0.0001
CO ₂	0.001	1	0.001	0.1	0.7	2903	1	2903	0.9	0.4	1498	1	1498	0.5	0.5
N	0.2	1	0.2	44	<0.0001	33883	1	33883	10	0.005	15751	1	15751	6	0.03
Exp. II															
total dry mass	3	1	3	486	<0.0001	1007297	1	1007297	349.1	<0.0001	232020	1	232020	215	<0.0001
CO ₂	0.001	1	0.001	0.9	0.3	13236	1	13236	4.6	0.04	11400	1	11400	11	0.002
Water	0.4	1	0.4	69	<0.0001	16480	1	16480	5.7	0.02	9063	1	9063	8	0.006
Water x total dry mass	0.2	1	0.2	35	<0.0001	13002	1	13002	4.500	0.04	7685	1	7685	7	0.01

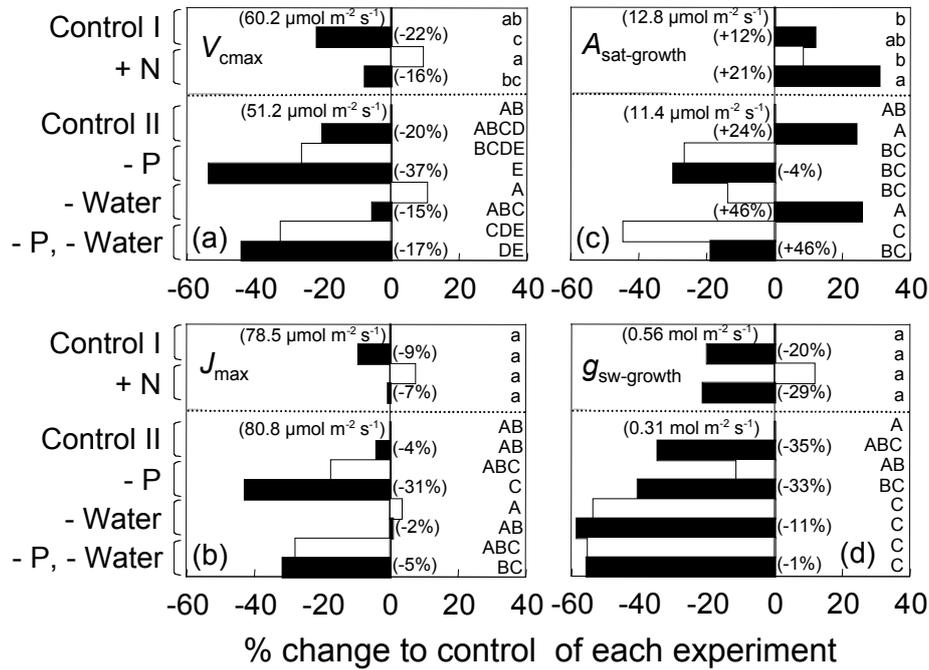


図 1. ケヤマハンノキの最大炭酸固定速度 (V_{cmax}) (a)、最大電子伝達速度 (J_{max}) (b)、それぞれの CO_2 濃度で測定した光飽和光合成速度 ($A_{sat-growth}$) (c) と気孔コンダクタンス ($g_{sw-growth}$) (d) の変化割合。各実験のコントロール (通常 CO_2) に対する変化割合で示した [100 x ((各処理の平均値) / (各実験のコントロールの平均値) - 1)]。白棒 通常 CO_2 、黒棒 CO_2 。上部 4 本の棒グラフは、実験 I (Exp-I) の結果を示す。下部の 8 本の棒グラフは実験 II (Exp-II) の結果を示す。“Control I”、Low-N (High-P と湿潤条件)；“+N”、High-N；“Control II”、High-P と湿潤条件 (Low-N)；“- P”、Low-P と湿潤条件；“- Water”、High-P と土壤乾燥条件；“- P, - Water”、Low-P と土壤乾燥 各 Control の棒グラフの箇所に示した括弧内の値はそれぞれの実験のコントロール (通常 CO_2) の平均値を表す。その他の括弧の中の値は、通常 CO_2 に対する高 CO_2 の割合を示した。グラフ右側の文字は多重比較の結果を示す (Turkey-Kramer post-hoc test, $P < 0.05$)。小文字が実験 I、大文字が実験 II の結果を示す

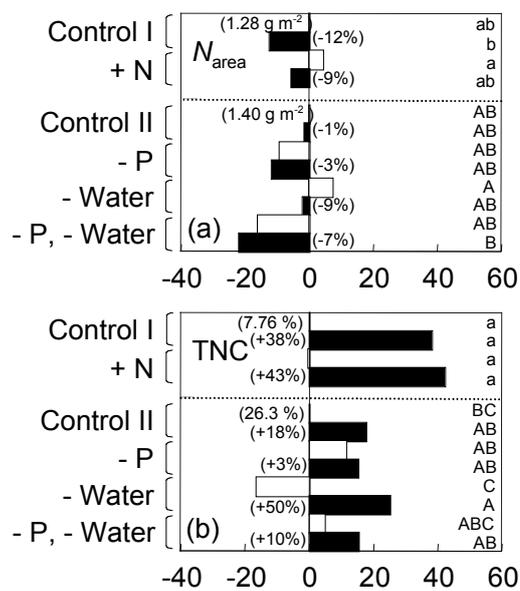


図2. ケヤマハンノキの単位葉面積あたりの窒素含量 (N_{area}) (a)、非構造性炭水化物 (TNC) (b) の変化割合。各実験のコントロールに対する変化割合で示した。図の書式は図1と同じである

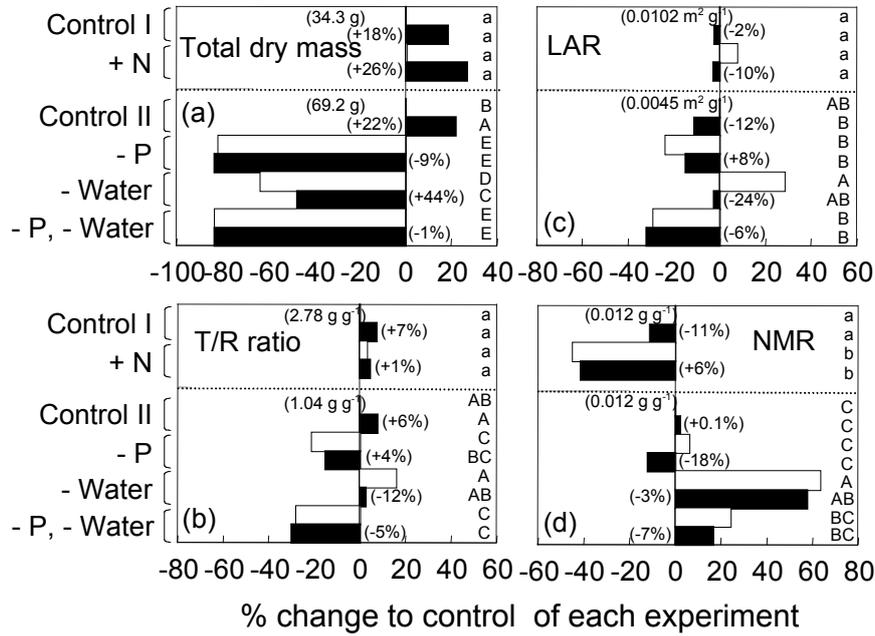


図 3. ケヤマハンノキの個体重量 (a)、地上部/地下部比 (T/R 比) (b)、葉面積比 (LAR) (c)、根粒重量 (NMR) (d) の変化割合。各実験のコントロールに対する変化割合で示した。図の書式は図 1 と同じである

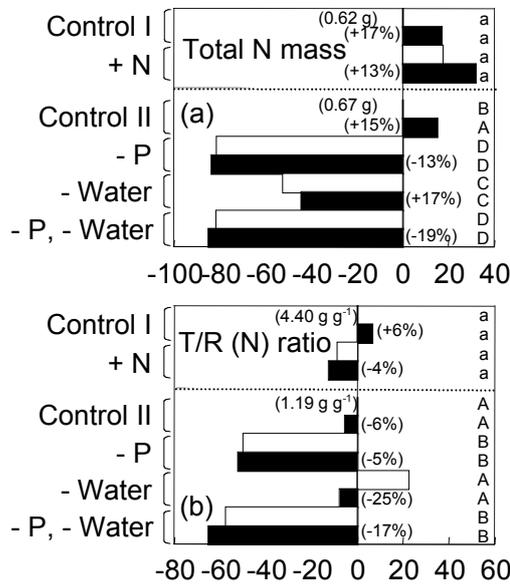


図 4. ケヤマハンノキの個体中の窒素含量 (a)、窒素の地上部/地下部比 (T/R (N) 比) (b) の変化割合。各実験のコントロールに対する変化割合で示した。図の書式は図 1 と同じである

第6章

総括

光合成は、植物にとって普遍的な機能である。葉内に含まれる窒素の大部分が光合成機能に投資されているため、光合成能力は葉の窒素含量と密接な正の相関関係を示す (Evans 1989)。そのため、光合成能力は、葉の窒素含量を左右する土壌の窒素栄養条件に大きく影響を受ける。光合成生産物を利用する場所をシンク、光合成生産物を供給する場所をソースと考えた場合に、植物体内のシンクとソースのバランスにより光合成能力が制御される (Kasai 2008)。窒素固定能を持たない樹種の場合、土壌中の窒素養分が不足した立地では、窒素リミットによる葉の窒素含量の低下という直接的な影響と、光合成生産量の低下に伴う成長量の低下によるシンク能の低下 (シンクリミット) という間接的な影響により、光合成能力が低下すると考えられる。従って、土壌中の養分不足により成長量が低下することも、一種のシンクリミットと考えることができる。これに対して窒素固定能を持つ樹種では、根に感染した根粒菌が根粒を形成し窒素固定を行うために多くの光合成生産物を利用するため、相対的にシンクが増加すると考えられる (Huss-Danell and Sellstedt 1983; Chapin et al. 2002)。窒素固定樹種は、窒素固定能力により窒素リミットを解除し、葉の窒素含量を高め、光合成能力を上昇させることができる。さらに、光合成能力の上昇により樹体の成長量が増加すると伴に根粒形成も促進され、窒素固定能が上昇しシンクリミットが解除される。窒素固定樹種では、このような一連の「窒素固定能力と光合成能力の間のフィードバック」が生じると考えられる。

本研究では、放線菌のフランキアと共生し窒素固定能を持つハンノキ属のケヤマハンノキを、「シンク能を高く維持することのできる樹種」という観点から研究対象とし、窒素固定樹種のモデルケースとした。生育環境で利用できる資源量 (例えば、大気中の CO_2 濃度、土壌中の窒素供給量やリン酸供給量、土壌水分量) が変動したり、制限されたりした場合のシンク能の高いケヤマハンノキの反応に関して、上述した「窒素固定能力と光合成能力の間のフィードバック」機構を考慮に入れた環境応答機構を解明することを目的とした。その中で、特に、高 CO_2 環境下での光合成のダウンレギュレーションを回避するメカニズムの解明に焦点を当てた。

6. 1 リン酸供給量が充分ある場合のケヤマハンノキの光合成反応

通常の CO₂ 濃度条件下で土壌中の窒素供給量が不足した場合、窒素固定能を持つケヤマハンノキは、予想外に、窒素供給量が多い場合に比べて単位面積当たりの葉の窒素含量 (N_{area}) が低下傾向を示し、光合成能力（特に、最大炭酸同化速度 (V_{cmax})）も低下傾向を示した（3. 2 節, 表 3, 図 1, 2, 4; 第 5 章, 図 1, 2）。この結果は、窒素供給量に対する根粒形成の反応の結果と併せて考えると大変興味深いことがわかる。土壌中の窒素供給量が多い場合に、窒素が少ない場合に比べて根粒形成が抑制されたが（3. 1 節, 図 1, 2; 第 5 章, 図 3）、同時に葉の窒素含量 (N_{area}) が増え光合成速度も上昇する傾向を示した。つまり、土壌窒素供給量が多い場合、生物窒素固定に比べてエネルギー消費の少ない土壌中の窒素を利用することができるため、根粒形成や窒素固定能力を調節するプロセス (Wall and Berry 2008) が作用して、葉の窒素含量と光合成速度の上昇がみられたものと考えられる。根粒で行う窒素固定のプロセスは樹体の成長と光合成生産物を競合する関係である。しかも、窒素固定に必要なエネルギー量は土壌中の窒素を吸収する場合に比べて 2 倍から 4 倍も多い (Chapin et al. 2002)。そのため、土壌窒素不足の立地でも生物窒素固定に必要とされるコストが、ある程度負担となっており、宿主植物側により葉の窒素含量や光合成能力を必要以上に上げないレベルに根粒形成や窒素固定能力が抑制されていることが推察された。

さらに興味深い点は、以上の葉の窒素含量と光合成能力、根粒形成で見られた土壌窒素供給量に対する反応が、高 CO₂ 環境下でも同様に見られた点である。この結果は、大気中の CO₂ 濃度が上昇し光合成の基質が増えた場合でも、光合成により余剰のエネルギーが生じて根粒をより多く形成し窒素固定能力を高めるわけではなく、樹体バイオマスに見合った量に根粒量を宿主植物側が調節していることを示唆する（3. 1 節, 図 2; 第 5 章, 図 3）。

しかも、土壌窒素が不足する場合に光合成能力が低下傾向を示したものの、その程度は顕著な低下ではなく、土壌窒素が多い場合と同様、先述した窒素固定能力と光合成能力の間のフィードバック機構により窒素リミットとシンクリミットの両方が解除され、高 CO₂ 下での光合成のダウンレギュレーションを回避していた。つまり、土壌窒素状態によらず、最大炭酸固定速度 (V_{cmax}) は低下したが、最大電子伝達速度 (J_{max}) の低下は V_{cmax} に比べて少なく、 $J_{\text{max}} / V_{\text{cmax}}$ 比が高 CO₂ で上昇し、生育 CO₂ 環境での光合成速度が高 CO₂ 下で上昇するという光合成応答を示した（3. 2 節, 図 5, 表 2; 第 5 章, 図 1）。 $J_{\text{max}} / V_{\text{cmax}}$ 比の上昇から、炭酸固定系のルビスコへの窒素配分を減らし、相対的に電子伝達系の窒素化合物への配分を増やすという、葉内の光合成機能内での窒素配分の変化が生じたと考えられた。この結果から、窒素固定樹種のケヤマハンノキが高 CO₂ に対する光合成反応で、

光合成の生化学モデル (Farquhar et al. 1980) から理論的に予想される葉内の最適窒素配分 (Drake et al. 1997; Makino et al. 1997; Hikosaka and Hirose 1998; Long et al. 2004) に近い窒素利用様式を示すことが示唆された。

以上の結果から、ケヤマハンノキは窒素固定能力により、高 CO_2 の窒素不足の立地でも葉の窒素含量を比較的高く保ち、高い光合成能力を維持することが明らかになった。「ケヤマハンノキは窒素固定能をもつため、窒素不足の貧栄養な立地でも生育し土壌を肥沃にする」ことはよく知られた窒素固定樹種の機能であるが、本研究の結果から、窒素固定能力により葉の窒素含量を高くし、光合成能力を高く維持することができ、その結果、樹木個体の成長量が増加し、相対成長関係により根粒形成が促進され、窒素固定能力が促進される、というフィードバック機構が作用して、光合成反応において窒素リミットとシンクリミットを回避していることが推察された。全てのハンノキ属樹種に当てはまるわけではないが、ケヤマハンノキの場合、根粒での窒素固定能力に加えて、順次開葉の成長様式による枝葉の連続的な生産も光合成生産物のシンクとなり、糖類蓄積による光合成機能への負の影響回避に貢献していると考えられる。

6. 2 窒素固定能力の有無による高 CO_2 に対する光合成応答の違い

ケヤマハンノキは高 CO_2 下で生育した場合、他の窒素固定能を持たないミズナラとイタヤカエデに比べて光合成能力の低下が少なかった (3. 2 節)。上述したように、ケヤマハンノキの高 CO_2 に対する特徴的な光合成反応は、 V_{cmax} の低下に比べて J_{max} の低下の程度が少なく、 $J_{\text{max}} / V_{\text{cmax}}$ 比が上昇した点であり、同様の結果は窒素供給量が不足する土壌でも見られ、この点が窒素固定樹種としての特徴と見なすことができる。一方、窒素固定能を持たないミズナラとイタヤカエデは、ケヤマハンノキの光合成反応と異なり、高 CO_2 でいずれも光合成のダウンレギュレーションを示した (高 CO_2 で V_{cmax} と J_{max} の両方とも低下し、 $J_{\text{max}} / V_{\text{cmax}}$ 比が変わらなかった)。ただし、ミズナラは、土壌中の窒素供給量が多い場合に限り、葉齢が高くなるまで (1.5 ヶ月) は光合成能力の低下が顕著ではなかった。成長のタイミングがシンク能との関連で高 CO_2 に対する光合成応答に影響を及ぼすことが示された。この光合成反応を反映して、ミズナラでは土壌中の窒素供給量が多い場合に限り高 CO_2 で成長量の増加が認められた。ケヤマハンノキと異なり土壌中の窒素供給量が不足する場合には、ミズナラ、イタヤカエデとも高 CO_2 下で生育 CO_2 濃度環境での光合成速度の上昇が見られず、樹体の成長量の増加が生じなかった。以上のように、窒素固定能力の有無により高 CO_2 に対する光合成応答が異なること、また遷移系列上の位置により窒素供給量の違いに対する光合成応答が異なる

ることが明らかになった。

6. 3 リン酸供給量不足に対するケヤマハンノキの光合成応答

土壌中のリン酸供給量不足により、ケヤマハンノキの光合成能力が低下し、樹木個体の成長量が低下し、根粒形成量も減少した（第4章；第5章）。リン酸は根粒形成の初期段階と宿主植物の成長のそれぞれに影響を及ぼす (Wall and Berry 2008)。リン酸不足下で葉の窒素含量が低下していたことから、リン酸不足により根粒形成が抑制され、窒素固定能力が抑制され、その結果、葉の窒素含量の低下と光合成能力の低下が生じるという窒素固定能力と光合成能力の間のフィードバックがリン酸供給量不足により生じたことが推察された。またリン酸不足はケヤマハンノキの成長抑制にも作用するため、シンクリミットも同時に生じたと考える。以上の一連の反応は高 CO_2 下でも同様に見られ、特に湿潤条件でリン酸供給量が不足した場合にケヤマハンノキも明らかな光合成のダウレギュレーションを示した (V_{cmax} と同様 J_{max} が低下し、生育環境 CO_2 での光合成速度が上昇しなかった)。土壌のリン酸供給量が少ない場合、ケヤマハンノキの光合成能力が低下し、樹木個体の成長量が抑制され、高 CO_2 下でも根粒バイオマスが増加しなかった。これらの結果から、リン酸不足の場合、高 CO_2 下でも窒素固定量の増加は期待できないことが示唆された。

6. 4 土壌乾燥に対するケヤマハンノキの光合成順化反応による補償効果

土壌の乾燥によりケヤマハンノキの成長量が低下し、根粒形成量も減少した（第4章；第5章）。土壌乾燥に対するケヤマハンノキの反応では、主に気孔反応が影響を及ぼす。土壌乾燥に伴い、気孔が閉鎖気味になり光合成速度が低下し、樹木個体の成長や根粒形成が抑制され、個体の窒素固定能力が抑制されたと考えられた。ただし、土壌乾燥の影響は、養分リミットの場合と異なり、灌水により水分環境が改善されれば、気孔が開き、光合成速度の上昇とともに窒素固定能が上昇するという光合成能力と窒素固定能力の間のフィードバック機構が作用すると考える。また、ケヤマハンノキは土壌乾燥に対して光合成能力の上昇（乾燥土壌で葉の窒素含量が上昇し、 V_{cmax} が上昇する）という順化反応を示した（第4章, 図6; 第5章, 図1）。この土壌乾燥に対する光合成の順化反応は気孔開度の低下による光合成速度のマイナス効果を緩和する作用があり、窒素固定能力と光合成能力の間のフィードバック機構に対して補償的な機構になると考えられる。この乾燥土壌に対する光合成の順化反応は土壌中のリン酸供給量が多い場合に高 CO_2 条件下でも顕著に見られた。高 CO_2 に対する光合成反応では V_{cmax} が低下するケースが多いため、本研究で示された乾燥土壌に対する光合成

の順化反応 (V_{cmax} の上昇) は、高 CO_2 下での光合成のダウンレギュレーションを緩和する作用があると考えられる。これまでに、土壌乾燥に対する光合成の順化反応はシラカンバで報告されているが (Kitao et al. 2007)、他の樹種でも同様の反応が見られるかどうかは未解明であった。乾燥土壌でも高 CO_2 によりケヤマハンノキの成長量と個体あたりの根粒バイオマスが増加したことから、ケヤマハンノキでは、窒素固定能力によるシンクリミットと窒素リミットの解除に加えて、光合成順化反応により乾燥土壌条件における高 CO_2 下での光合成ダウンレギュレーションが回避されていることが明らかになった。

6. 5 ケヤマハンノキの光合成反応が生態系へ及ぼす影響

以上のような、ケヤマハンノキが窒素不足の立地でも高い光合成機能を維持し、光合成能力と窒素固定能力の間のフィードバックにより窒素固定能力を高く維持するという性質は、森林生態系において、土壌攪乱跡等で生じた窒素不足の貧栄養な立地の生態系改変 (土壌肥沃化や植生遷移の促進等) に寄与する性質と考える。本研究の前半部分で、データ蓄積の少ない林分当たりの窒素固定量を評価するために、林道工事跡地に成立したケヤマハンノキの天然更新林分で窒素固定量の推定を行い、林分内の窒素移動量・蓄積量に対する窒素固定量の寄与を明らかにした。本研究では、単位根粒重量あたりの窒素固定活性 (アセチレン還元活性; ARA) の説明変数として、着葉量と根粒のサイズ、土壌温度を用いて計算した結果、葉リター中に含まれる窒素量の少なくとも約半分に相当する量を窒素固定により吸収していることが推定された (2. 2節, 表 4-3, 図 10)。これまでの林分単位の窒素固定量の報告例の中で高い値ではなかったが、約 18 年生の林分における窒素固定能力への依存の程度を明らかにすることができた。

林分内では胸高直径 (dbh) の小さな被圧木に枯死が多く見られた。根粒 1 g あたりのニトロゲナーゼ活性と樹木個体サイズの間には一貫した関連性はみられなかったが、被圧木の dbh 増加率は林冠木に比べて少なかった (2. 2節, 図 2, 5)。被圧木では光資源の制限により光合成が抑制され、樹体の成長量や根粒形成が抑制され、窒素固定能力が抑制されるという、光合成能力と窒素固定能力との間のフィードバックが生じ、その結果、徐々に衰退することが推察された。

ケヤマハンノキの窒素固定能力により土壌が肥沃化される過程には、生葉の窒素濃度が高く、落葉時の窒素再吸収効率が低い結果、葉リターの窒素濃度が高いこと、さらに、窒素濃度の高い葉リターの分解速度が速いことが寄与していた (2. 2節, 表 3, 図 7)。さらには、葉の被食圧が高く虫糞が多く林床に供給される点もケヤマハンノキ林分の特徴の1つと考えることができるだろう (2.

2節, 表 2, 図 3)。また、ケヤマハンノキの分布と林床に更新している他樹種の稚樹との間の分布相関を解析した結果、鳥散布型の種子を持つ樹種の中の数樹種がケヤマハンノキと同所的に分布していることが明らかになった(2. 3節, 図 5)。間接的な効果ではあるが、ケヤマハンノキの窒素固定能力が、土壤肥沃化のみではなく、植生遷移における更新樹種の分布や樹種構成にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

6. 6 まとめ

ケヤマハンノキは窒素固定能力により生態系内に大気中から窒素を供給し立地環境の改善に寄与するが、この窒素固定能力は光合成能力との間に密接な関係を持ち、生育環境の資源量の変化に対する光合成反応にも影響を及ぼすことが明らかになった。土壤中の窒素供給量が不足する立地でも、葉の窒素含量を高くすることで光合成能力が高まり、樹体の成長量の増加とそれに伴う根粒形成の促進を通じて窒素固定能が上昇するという形でフィードバックが生じることがわかった。しかも、窒素不足の立地でも光合成機能を高く維持できるという能力は、大気中の CO_2 濃度上昇に対する光合成反応において、光合成のダウンレギュレーションを回避することに繋がることが明らかになった。高 CO_2 環境で光合成のダウンレギュレーションが生じるのは、シンク・ソースバランスにおけるシンク不足による葉内の糖類蓄積や、窒素供給量不足(こちらにもシンクリミットに関連する)が主な原因であると考えられているが、窒素固定樹種であるケヤマハンノキはシンクリミットと窒素リミットの両方を回避することができたため、他の窒素固定能を持たない樹種(本研究では、遷移中期種のみズナラや遷移後期種のイタヤカエデ)と光合成反応が異なり、高 CO_2 下で通常 CO_2 濃度条件下よりも高い光合成速度を維持することができることがわかった。その結果、樹体の成長量の増加とそれに伴う根粒量の増加が生じ、樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが明らかになった。根粒のニトロゲナーゼ活性には高 CO_2 に対する顕著な反応が見られなかった。ただし、土壤中の窒素供給量が多い場合、通常 CO_2 下と同様に、高 CO_2 下でも根粒形成が抑制されることが明らかになった。また、土壤のリン酸供給量が不足する場合、根粒形成の抑制と宿主であるケヤマハンノキの成長量の抑制が生じ、窒素固定能力低下と光合成能力低下というフィードバックが生じ、高 CO_2 下で光合成のダウンレギュレーションを回避することができず、高 CO_2 下でも窒素固定量が増加しないことが示唆された。さらに、土壤の乾燥が続く場合、樹体の成長量が抑制されるが、土壤のリン酸供給量が充分であれば高 CO_2 下で樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが明らかになった。

謝辞

本論文を作成するにあたり、京都大学大学院農学研究科地域環境科学専攻の北山兼弘教授には、草稿を校閲していただき、論文の構成からまとめ方まで懇切なご指導を賜り、また本論文を作成する機会を与えていただいたことに、心より深く感謝申し上げます。京都大学大学院農学研究科地域環境科学専攻の谷誠教授、東順一教授、京都大学大学院農学研究科森林科学専攻の大澤晃教授には、本論文全般に関して貴重なご助言をいただいた。心より御礼申し上げます。

本論文の内容は京都大学農学研究科博士後期課程林学専攻進学後に実施した研究と、森林総合研究所に就職し北海道支所へ配属後に実施した一連の研究成果をまとめたものである。京都大学農学部林学科卒業論文「田上山のクロマツ砂防造林地における樹木の分布と更新に関する研究」と、京都大学農学研究科林学専攻修士論文「有機物量の異なる土壌におけるヒメヤシャブシの成長と窒素固定活性」の内容は含んでいないが、本論文は、これらの研究で得られた知見と発想を基に発展させ、まとめることのできた研究内容であると認識している。この間、多くの方々から多大なご協力、ご指導を賜り、研究を進めることができた。ご支援下さった皆様に心から感謝を申し上げます。

京都大学森林生態学研究室に在籍中、多くの先生方はじめ、研究室員の方々にお世話になった。岩坪五郎様には、生物窒素固定のテーマを紹介していただき、測定手法や調査地設定等あらゆる面で研究のご指導とご支援を賜った。武田博清様には、野外調査でご協力いただき、調査方法やデータの解析で多くの有益なご助言をいただいた。川口英之様には、卒業論文をまとめる際にたいへんお世話になり、研究に対する姿勢を教えていただき、また、遠方での野外調査に対してご理解とご支援をいただいた。徳地直子様には、窒素循環について教えていただき、生物窒素固定の研究をご支援いただいた。大澤直哉様には、本論文を作成する際に貴重なご助言をいただいた。

榎木勉様には、3回生の実習以来、長きにわたりお世話になった。卒業論文では同じ調査地で研究をおこない、調査手法やデータ解析に加え、車の運転方法等多くのことを学ばせていただいた。長谷川元洋様には、研究だけでなく、日々の生活でも多くのことを教えていただきたいへんお世話になった。名波哲様には、本論文中の更新樹種の分布解析をしていただき、同期として日々ご支援いただいた。八木貴信様には、研究で得たデータを処理する際の取り組む姿勢を教えていただき、同期として日々を共に過ごしていただいた。長谷川成明様には、高山市のケヤマハンノキ林分での調査に2年間ご協力いただき、多くの時間を共に過ごし有益な議論をさせていただいた。田興軍様

には、植物分類や物質循環について教わると共に、野外調査にご協力いただいた。山下多聞様には、スギ落葉の分解実験を一緒にさせて頂くとともに、分析方法を教えていただいた。長田典之様には、本論文の発表内容をまとめる際に貴重なご意見をいただいた。稲垣昌宏様には、生物窒素固定に関して有益な情報を提供していただいた。釣田竜也様には、本論文の作成過程でご支援いただいた。長山泰秀様、金子隆之様、金子有子様、糟谷信彦様、石井弘明様、荒木眞岳様、仲川泰則様、木庭啓介様、廣部宗様、舘野隆之介様、稲垣善之様、小野曜様、小山里奈様、大園享司様、保原達様、立石貴浩様をはじめ森林生態学研究室に在籍した皆様には、研究に対するご協力と有益なご助言をいただいた。永井久枝様には、研究が滞りなく進展するように日々ご支援いただいた。

安藤辰夫様には、高山市のケヤマハンノキ林分の調査地の選定をしていただき、調査を進める間も多大なご支援を賜った。また、周辺の森林を案内していただき、生態系について多くのことを学ばせていただいた。西村和雄様には、生物窒素固定の基礎について教えていただき、アセチレン還元法の手法をご教授いただいた。安藤信様には、窒素分析でたいへんお世話になった。二井一禎様には、フランキアを対象とした研究内容に興味を示していただき、常に研究の進展をご支援いただいた。小杉緑子様には、光合成の測定とモデルについて教えていただいた。車戸憲二様、斉藤敦様をはじめ岐阜大学流域環境研究センターの皆様には、調査のための施設の利用を快く認めていただいた。心より感謝申し上げます。

森林総合研究所に就職し、北海道支所で研究を開始してから今まで、多くの方々に大変お世話になった。丸山温様には、樹木生理に関する研究を、基本から教えていただくと共に、就職後、常に、本論文をまとめる上でご協力いただき、多くの有益な助言をいただいた。北尾光俊様には、光合成活性の測定方法とデータの解釈、投稿論文の作成まで、多くのことを学ばせていただき、本論文の作成に際してご支援いただいた。宇都木玄様には、樹冠部での光合成測定の手法や、種々の野外調査について学ばせていただくと共に、実験室での研究遂行に理解をいただき、多大なるご協力とご支援をいただいた。上村章様には、実験計画や測定手法の確立、データの解釈に関して有益なご助言とご支援をいただいた。田岡ヒロ子様、三馬康太郎様、大淵真理恵様、山本春芳様には、苗木の育成から測定まで年間を通じて実験の補助をしていただいた。矢崎健一様、香山雅純様、北岡哲様をはじめ樹木生理研究室と植物土壌系研究グループの皆様、北海道支所の皆様には、多くの有益なご助言をいただいた。北海道支所庶務課の皆様には、環境調節実験施設の維持管理でたいへんお世話になった。心より感謝申し上げます。森貞和仁様には、本論文の作成に際し、有益なご助言とご支援をいただいた。森茂太様には、学会発表をした際に興味深い研究と声を掛けて頂き、研究の進展

を励ましていただいた。山中高史様には、フランキアに関して有益な情報の交換をさせていただいた。齊藤昌宏様、石塚森吉様、田内裕之様、松本陽介様、清野嘉之様、田中浩様をはじめ森林総合研究所の多くの方々に本論文作成へ向けにご支援いただいた。

北海道大学農学研究院造林学研究室の小池孝良様には、就職当初から、環境制御実験に関する様々なことを学ばせていただいた。ハンノキ属樹種を対象とした研究にもご理解とご支援をいただき共同研究でも多くの有益なご助言をいただいた。渡邊陽子様には、共同研究を行い、論文を共著でまとめ、投稿し受理されるまでの過程と一緒に学ばせていただく機会をいただいた。この経験を、その後の自分の投稿論文作成に大いに役立てることができた。上里秀悠様には、共同で研究を行い、分析手法を教えていただくとともに、実験・測定に対する姿勢を再確認する機会をいただいた。

フランキアとアクチノリザル植物の国際会議の第 15 回と第 16 回大会で有益な議論を交わしていただいた参加者の皆様には、フランキア共生の窒素固定植物の研究を進めることの意義を教えてください。心より御礼申し上げます。Kerstin Huss-Danell 様には、論文でハンノキ属樹種の生物窒素固定に関する研究の興味深さを教えていただき、フランキア国際会議では自分の発表の座長をしていただく機会を得て有益なご助言をいただいた。九町健一様には、フランキアに関して最新の研究成果について有益な情報を提供していただいた。Lidwine Le Mire Pecheux 様には、国際学会で有益なご意見をいただき、本論文の完成にご支援いただいた。投稿論文を公表する際に、Rana Munns 様、Ana Ribeiro 様、David Richardson 様、Euan K. James 様、Sune Linder 様、Ulrich E. Lüttge 様には、貴重なご助言をいただいた。

本論文を構成する研究の一部では、以下のプロジェクト等から研究費を受け、研究を助成していただいた。日本学術振興会特別研究員 DC1 研究費「荒廃林復旧施業における空中窒素固定樹種の有効性についての生態学的研究」(NO. 91567、日本学術振興会、平成 6 年から平成 9 年)、新世紀重点研究創世プラン (RR2002) 「陸域生態系パラメタリゼーションに関する研究」(文部科学省、平成 14 年から平成 18 年)、イノベーション創出基礎的研究推進事業「バイオマス生産基盤としての植物 CO₂ 応答機構の解明」(生物系特定産業技術研究支援センター、平成 20 年から平成 24 年)。

これまで、いつも温かく見守っていただいた家族の皆様にご心より御礼申し上げます。探求心を持つことのおもしろさを教えてくれる父、飛田博温様、いつでも身体を大切にすることを気遣ってくれる母、飛田伶様、いつも味方でいてくれる次兄、飛田博陽様、皆様の変わらぬご支援とご協力にご心より感謝申し上げます。最後に、研究を始める前から一番近くで支えてくれた妻、飛田しのぶ様に、心から感謝申し上げます。ありがとう。この論文を、長兄、飛田博滋様に捧げる。

引用文献

- Aber JD, Mellilo JM, McClaugherty CA (1990) Predicting long-term patterns of mass loss, nitrogen dynamics, and soil organic matter formation from initial fine litter chemistry in temperate forest ecosystems. *Can J Bot* 68: 2201-2208.
- Adam NR, Wall GW, Kimball BA, Pinter PJ, LaMorte RL, Hunsaker DJ, Adamsen FJ, Thompson T, Matthias AD, Leavitt SW, Webber AN (2000) Acclimation response of spring wheat in a free-air CO₂ enrichment (FACE) atmosphere with variable soil nitrogen regimes. 1. Leaf position and phenology determine acclimation response. *Photosynth Res* 66: 65-77.
- Aerts R, Chapin FSIII (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Adv Ecol Res* 30: 1-67.
- Aerts R, Cornelissen JHC, van Loghestijn RSP, Callaghan TV (2007) Climate change has only a minor impact on nutrient resorption parameters in a high-latitude peatland. *Oecologia* 151: 132-139.
- Agari T, Mtsuki S, Tobita H, Sasa K, Koike T (2007) The effects of elevated CO₂ and soil fertility on the defense capacity against herbivore in two species of alder seedlings. *Trans Mtg Hokkaido Br For Soc* 55: 56-58 (in Japanese).
- Ainsworth EA, Long SP (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytol* 165: 351-372.
- Ainsworth EA, Rogers A (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell Environ* 30: 258-270.
- Ainsworth EA, Rogers A, Nelson R, Long SP (2004) Testing the 'source-sink' hypothesis of down-regulation of photosynthesis in elevated [CO₂] in the field with single gene substitutions in *Glycine max*. *Agric For Meteorol* 122: 85-94.
- Akkermans ADL, van Dijk C (1976) The formation and nitrogen-fixing activity of the root nodules of *Alnus glutinosa* under field conditions. In: Nutman PS (ed) *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Cambridge University Press, London, pp 511-520.
- Anten NPR, Werger MJA (1996) Canopy structure nitrogen distribution in dominant and subordinate plants in a

- dense stand of *Amaranthus dubius* L. with a size hierarchy of individuals. *Oecologia* 105: 30-37.
- Armest JJ, Pickett STA, McDonnell MJ (1991) Spatial heterogeneity during succession: a cyclic model of invasion and exclusion. In: *Ecological Heterogeneity*. Kolasa J, Pickett STA (eds.) Springer-Verlag, Inc., New York, pp 256-269.
- Arnone III JA, Gordon JC (1990) Effect of nodulation, nitrogen fixation and CO₂ enrichment on the physiology, growth and dry mass allocation of seedlings of *Alnus rubra* Bong. *New Phytol* 116: 55-66.
- Arp WJ (1991) Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Cell Environ* 14: 869-875.
- Asher CJ, Edwards DG (1983) Modern solution culture techniques. In: Lauchli A, Bielecki RL (eds.) *Inorganic plant nutrition*. Encyclopedia of plant physiology, NS. vol 15A. Springer, Berlin, pp 94-119.
- Bailey RL, Dell TR (1973) Quantifying diameter distributions with the Weibull function. *For Sci* 19: 97-104.
- Baker DD, Schwintzer CR (1990) Introduction. In: Schwintzer CR, Tjepkema JD (eds) *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Academic Press, Inc., Tokyo, pp 1-13.
- Berg B (1986) Nutrient releases from litter and humus in coniferous forest soils - a mini review. *Scandinavian J For Res* 1: 359-369.
- Berg B, Ekbohm G, Johansson M-B, McCaugherty C, Rutigliano F, Virzo De Santo A (1996) Maximum decomposition limits of forest litter types: a synthesis. *Can J Bot* 74: 659-672.
- Bernacchi CJ, Singaas EL, Pimentel C, Portis Jr AR, Long SP (2001) Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant Cell Environ* 24: 253-259.
- Bernacchi CJ, Morgan PB, Ort DR, Long SP (2005) The growth of soybean under free air [CO₂] enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing *in vivo* rubisco capacity. *Planta* 220: 424-446.
- Besag J (1977) Contribution to the discussion on Dr. Ripley's paper. *J Roy Stat Soc B* 39: 193-195.
- Binkley D (1981) Nodule biomass and acetylene reduction rates of red alder and Sitka alder on Vancouver Island, B.C. *Can J For Res* 11: 181-286.
- Binkley D (1982) Nitrogen fixation and net primary production in a young Sitka alder stand. *Can J Bot* 60: 281-284.
- Binkley D (1992) Comparison of methods for estimating soil nitrogen transformations in adjacent conifer and alder-conifer forests. *Can J For Res* 22: 858-863.
- Binkley D, Hart SC (1989) The components of nitrogen availability assessments in forest soils. *Advances in Soil*

Sci 10: 57-112.

Blouin M, Barot S, Roumet C (2007) A quick method to determine root biomass distribution in diameter classes. *Plant Soil* 290: 371-381.

Bocock KL (1964) Changes in the amount of dry matter, nitrogen, carbon and energy in decomposing woodland leaf litter in relation to the activity of the soil fauna. *J Ecol* 61: 481-485.

Bollman MI, Vessey JK (2006) Differential effects of nitrate and ammonium supply on nodule initiation, development, and distribution on roots of pea (*Pisum sativum*). *Can J Bot* 84: 893-903.

Bond G (1983) Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixation systems. In: Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: Foundations and applications. Gordon JC, Wheeler CT (eds.) The Hague, The Netherlands pp 55-87.

Bormann BT, Gordon JC (1984) Stand density effects in young red alder plantations: productivity, photosynthate partitioning, and nitrogen fixation. *Ecology* 65: 394-402.

Bown HE, Watt MS, Clinton PW, Mason EG, Richardson B (2007) Partitioning concurrent influences of nitrogen and phosphorus supply on photosynthetic model parameters of *Pinus radiata*. *Tree Physiol* 27(3): 335-44.

Brockley RP, Sanborn P (2003) Effects of sitka alder on the growth and foliar nutrition of young lodgepole pine in the central interior of British Columbia. *Can J For Res* 33: 1761-1771.

Calfapietra C, Angelis PD, Gielen B, Lukac M, Moscatelli MC, Avino G, Lagomarsino A, Polle A, Ceulemans R, Mugnozza GS, Hoosbeek MR, Cotrufo MF (2007) Increased nitrogen-use efficiency of a short-rotation poplar plantation in elevated CO₂ concentration. *Tree Physiol* 27: 1153-1163.

Callaway RM, Walker LR (1997) Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology* 78: 1958-1965.

Carlson PJ, Dawson JO (1985) Soil nitrogen changes, early growth, and response to soil internal drainage of a plantation of *Alnus jorullensis* in the Colombian highlands. *Turrialba* 35: 141-150.

Ceulemans R, Mousseau M (1994) Effects of elevated atmospheric CO₂ on woody plants. *New Phytol* 127: 425-446.

Ceulemans R, Janssens IA, Jach ME (1999) Effects of CO₂ enrichment on trees and forests: Lessons to be learned in view of future ecosystem studies. *Annals Botany* 84: 577-590.

Chapin FSIII (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Ann Rev Ecol Syst* 11: 233-260

- Chapin FSIII, Kedrowski RA (1983) Seasonal changes in nitrogen and phosphorus fractions and autumn retranslocation in evergreen and deciduous taiga trees. *Ecology* 64: 376-391.
- Chapin FSIII, Walker LR, Fastie CL, Sharman LC (1994) Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier bay, Alaska. *Ecol Monog* 64(2): 149-175.
- Chapin FSIII, Matson PA, Mooney HA (2002) *Principles of terrestrial ecosystem ecology*. Springer, 177pp.
- Chapman JA, King JS, Pregitzer KS, Zak DR (2005) Effects of elevated concentrations of atmospheric CO₂ and tropospheric O₃ on decomposition of tree fine roots. *Tree Physiol* 25: 1501-1510.
- Charles-Edwards DA, Stutzel H, Ferraris R, Beech DF (1987) An analysis of spatial variation in the nitrogen content of leaves from different horizons within a canopy. *Ann Bot* 60: 421-426.
- Coleman M (2007) Spatial and temporal patterns of root distribution in developing stands of four woody crop species grown with drip irrigation and fertilization. *Plant Soil* 299: 195-213.
- Côté B, Vogel C, Dawson JO (1989) Autumnal changes in tissue nitrogen of autumn olive, black alder, and eastern cottonwood. *Plant Soil* 118: 23-32.
- Cotrufo MF, Ineson P (1996) Elevated CO₂ reduces field decomposition rates of *Betula pendula* (Roth.) leaf litter. *Oecologia* 106: 525-530.
- Cotrufo MF, Ineson P, Scott A (1998) Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biol* 4: 43-54.
- Cromack K, Todd RL, Monk CD (1975) Patterns of basidiomycete nutrient accumulation in conifer and deciduous forest litter. *Soil Biol Biochem* 7: 265-268.
- Curtis PS (1996) A meta-analysis of leaf gas exchange and nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. *Plant Cell Environ* 19: 127-137.
- Curtis PS, Vogel CS, Wang XZ, Pregitzer KS, Zak DR, Lussenhop J, Kubiske M, Teeri JA (2000) Gas exchange, leaf nitrogen, and growth efficiency of *Populus tremuloides* in a CO₂-enriched atmosphere. *Ecol Appl* 10: 3-17.
- Cyr H, Pace ML (1993) Magnitude and patterns of herbivory in aquatic and terrestrial ecosystems. *Nature* 361: 148-150.
- Davey PA, Olcer H, Zakhleniuk O, Bernacchi CJ, Calfapietra C, Long SP, Raines CA (2006) Can fast growing plantation trees escape biochemical down-regulation of photosynthesis when grown throughout their complete production cycle in the open air under elevated carbon dioxide? *Plant Cell Environ* 29: 1235-

1244.

- Dawson JO (1983) Dinitrogen fixation in forest ecosystems. *Can J Microbiol* 29: 979-992.
- Dawson JO (2008) Ecology of actinorhizal plants. In: Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses. Pawlowski K, Newton WE (eds) Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 119-234.
- Dawson JO, Funk DT (1981) Seasonal change in foliar nitrogen concentration of *Alnus glutinosa*. *Forest Sci* 27(2): 239-243.
- Diggle PJ (1983) Statistical analysis of spatial point pattern. Academic Press, London, UK, 148 pp.
- Drake BG, González-Meler MA, Long SP (1997) More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 609-639.
- Edmonds RL (1980) Litter decomposition and nutrient release in Douglas-fir, red alder, western hemlock, and Pacific silver fir ecosystems in western Washington. *Can J For Res* 10: 327-337.
- Edwards EJ, McCaffery S, Evans JR (2006) Phosphorus availability and elevated CO₂ affect biological nitrogen fixation and nutrient fluxes in a clover-dominated sward. *New Phytol* 169: 157-167.
- Eguchi N, Karatsu K, Ueda T, Funada R, Takagi K, Hiura T, Sasa K, Koike T (2008) Photosynthetic responses of birch and alder saplings grown in a free air CO₂ enrichment system in northern Japan. *Trees* 22: 437-447.
- Ekblad A, Huss-Danell K (1995) Nitrogen fixation by *Alnus incana* and nitrogen transfer from *A. incana* to *Pinus sylvestris* influenced by macronutrients and ectomycorrhiza. *New Phytol* 131: 453-459.
- Ekblad A, Lundquist P-O, Sjöström M, Huss-Danell K (1994) Day-to-day variation in nitrogenase activity of *Alnus incana* explained by weather variables: a multivariate time series analysis. *Plant Cell Environ* 17: 319-325.
- Enoki T, Kawaguchi H (1999) Nitrogen resorption from needles of *Pinus thunbergii* Parl. growing along a topographic gradient of soil nutrient availability. *Ecol Res* 14: 1-8.
- Enoki T, Kawaguchi H (2000) Initial nitrogen content and topographic moisture effects on the decomposition of pine needles. *Ecol Res* 15: 425-434.
- Enoki T, Kawaguchi H, Iwatsubo G (1997) Nutrient-uptake and nutrient-use efficiency of *Pinus thunbergii* Parl. along a topographical gradient of soil nutrient availability. *Ecol Res* 12: 191-199.
- Erice G, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Avice JC, Ourry A (2007) Effect of drought, elevated CO₂ and temperature on accumulation of N and vegetative storage proteins (VSP) in taproot of nodulated alfalfa

- before and after cutting. *Plant Science* 172(5): 903-912.
- ESF-Forest FACE Group, Calfapietra C, Ainsworth EA, Beier C, Angelis PD, Ellsworth DS, Godbold DL, Hendrey GR, Hickler T, Hoosbeek MR, Karnosky DF, King J, Körner C, Leakey ADB, Lewin KF, Liberloo M, Long SP, Lukac M, Matyssek R, Miglietta F, Nagy J, Norby RJ, Oren R, Percy KE, Rogers A, Mugnozza GS, Stitt M, Taylor G, Ceulemans R (2010) Challenges in elevated CO₂ experiments on forests. *Trends in Plant Science* 15(1): 5-10.
- Evans JR (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78: 9-19.
- Evans JR, Seeman JR (1989) The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences, and control. In: *Photosynthesis*. Briggs WR, Alan R (eds.) Liss Press, New York. pp 183-205.
- Farquhar GD, Sharkey TS (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 33: 317-345.
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic acclimation in leaves of C₃ species. *Planta* 149: 78-90.
- Field C (1983) Allocation leaf nitrogen for the maximization of carbon gain: leaf age as a control on the allocation program. *Oecologia* 56: 341-347.
- Finegan GB (1984) Forest succession. *Nature* 312: 109-114.
- Finzi AC, Allen AS, DeLucia EH, Ellsworth DS, Schlesinger WH (2001) Forest litter production, chemistry, and decomposition following two years of free-air CO₂ enrichment. *Ecology* 82(2): 470-484.
- Flexas J, Medrano H (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot* 89: 183-189.
- Fraga-Beddiar A, Tacon FLe (1990) Interactions between a VA mycorrhizal fungus and *Frankia* associated with alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaerten.). *Symbiosis* 9: 247-258.
- Frak E, LeRoux X, Millard P, Dreyer E, Jaouen G, Saint-Joanis B, Wendler R (2001) Changes in total leaf nitrogen and partitioning of leaf nitrogen drive photosynthetic acclimation to light in fully developed walnut leaves. *Plant Cell Environ* 24: 1279-1288.
- Frost CJ, Hunter MD (2007) Recycling of nitrogen in herbivore feces: plant recovery, herbivore assimilation, soil retention, and leaching losses. *Oecologia* 151: 42-53.
- Gentili F, Huss-Danell K (2003) Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. *J Exp Bot* 54: 2757-2767.

- Geßler A, Keitel C, Kreuzwieser J, Matyssek R, Seiler W, Rennenberg H (2007) Potential risks for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a changing climate. *Trees* 21: 1-11.
- Gill RA, Anderson LJ, Polley HW, Johnson HB, Jackson RB (2006) Potential nitrogen constraints on soil carbon sequestration under low and elevated atmospheric CO₂. *Ecology* 87(1): 41-52.
- Gleadow RM, Foley WJ, Woodrow IE (1998) Enhanced CO₂ alters the relationship between photosynthesis and defence in cyanogenic *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell. *Plant Cell Environ* 21: 12-22.
- Greig-Smith P (1979) Pattern in vegetation. *J Ecol* 67: 755-779.
- Gress SE, Nichols TD, Northcraft CC, Peterjohn WT (2007) Nutrient limitation in soil exhibiting differing nitrogen availabilities: what lies beyond nitrogen saturation? *Ecology* 88(1): 119-130.
- Haeussler S, Tappeiner JC, Greber BJ (1995) Germination, survival, and early growth of red alder seedlings in the central Coast Range of Oregon. *Can J For Res* 25: 1639-1651.
- Hall MC, Stiling P, Moon DC, Drake BG, Hunter MD (2005) Effects of elevated CO₂ and herbivore damage on litter quality in a scrub oak ecosystem. *J Chem Ecol* 31(10): 2343-2356.
- Hall MC, Stiling P, Moon DC, Drake BG, Hunter MD (2006) Elevated CO₂ increases the long-term decomposition rate of *Quercus myrtifolia* leaf litter. *Global Change Biol* 12(3): 568-577.
- Hall RB, McNabb JR HS, Maynard CA, Green TL (1979) Toward development of optimal *Alnus glutinosa* symbioses. *Bot. Gaz.* 140(Suppl.): S120-S126.
- Hanley TA, Deal RL, Orlikowska EH (2006) Relationships between red alder composition and understory vegetation in young mixed forests of southeast Alaska. *Can J For Res* 36: 738-748
- Hardy RWF, Holsten RD, Javkson EK, Burns RC (1968) The acetylene - ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43: 1185-1207.
- Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD (1973) Application of the acetylene-ethylene assay for the measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Biochem* 5: 47-81.
- Harrison EP, Olcer H, Lloyd JC, Long SP, Raines CA (2001) Small decreases in SPase cause a linear decline in the apparent RuBP regeneration rate, but do not affect Rubisco carboxylation capacity. *J Exp Bot* 52: 1779-1784.
- Hartwig UA, Zanetti S, Hebeisen T, Lüscher A, Frehner M, Fischer BU, van Kessel C, Hendrey GR, Blum H, Nösberger J (1996) Symbiotic nitrogen fixation: one key to understand the response of temperate grassland-ecosystems to elevated CO₂? In: *Carbon Dioxide, Populations, and Communities*. Körner C,

- Bazzaz FA (eds.) Academic Press, San Diego, CA, pp 253-264.
- Hasegawa M, Takeda H (1996) Carbon and nutrient dynamics in decomposing pine needle litter in relation to fungal and faunal abundances. *Pedobiologia* 40: 171-184.
- Hasegawa S, Takeda H (2001) Functional specialization of current shoots as a reproductive strategy in Japanese alder (*Alnus hirsuta* var. *sibirica*). *Can J Bot* 79(1): 38-48.
- Hasegawa S, Takeda H (2004) Current-year shoot based approach for annual variation in the reproductive output in Siberian alder (*Alnus hirsuta* var. *sibirica*). *Trees* 18: 436-441.
- Hatton TJ (1989) Spatial analysis of a subalpine heath woodland. *Aust J Ecol* 14: 65-75.
- Hawkins BJ, MacDonald S (1994) The influences of temperature and soil water on growth, photosynthesis, and nitrogen fixation of red alder (*Alnus rubra*) seedlings. *Can J For Res* 24: 1029-1032.
- Helmisaari H-S, Derome J, Nöjd P, Kukkola M (2007) Fine root biomass in relation to site and stand characteristics in Norway spruce and Scots pine stands. *Tree Physiol* 27: 1493-1504.
- Hendricks JJ, Hendrick RL, Wilson CA, Mitchell RJ, Pecot SD, Guo D (2006) Assessing the patterns and controls of fine root dynamics: an empirical test and methodological view. *J Ecol* 94: 40-57.
- Hibbs DE, Cromack CJr (1990) Actinorhizal plants in pacific northwest forests. In: Schwintzer CR, Tjepkema JD (eds), *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Academic Press, Inc., San Diego. pp 343-363.
- Hibbs DE, Chan SS, Castellano M, Niu C-H (1995) Response of red alder seedlings to CO₂ enrichment and water stress. *New Phytol* 129: 569-577.
- Hikosaka K (2003) A model of dynamics of leaves and nitrogen in a plant canopy: an integration of canopy photosynthesis, leaf life span, and nitrogen use efficiency. *Am Nat* 162: 149-164.
- Hikosaka K (2004) Interspecific difference in the photosynthesis-nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *J Plant Res* 117: 481-494.
- Hikosaka K, Hirose T (1998) Leaf and canopy photosynthesis of C₃ plants at elevated CO₂ in relation to optimal partitioning of nitrogen among photosynthetic components: theoretical prediction. *Ecological Modelling* 106: 247-259.
- Hirobe M, Koba K, Tokuchi N (2003) Dynamics of the internal soil nitrogen cycles under moder and mull forest floor types on a slope in a *Cryptomeria japonica* D. Don plantation. *Eco Res* 18: 53-64.
- Hobara S, McCalley C, Koba K, Giblin AE, Weiss M, Gettel GM, Shaver GR (2006) Nitrogen fixation in surface soils and vegetation in an arctic tundra watershed: a key source of atmospheric nitrogen. *Arctic*

- Antarctic Alpine Res 38: 363-372.
- Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA (2001) Climate Change 2001 : the scientific basis. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 881 pp.
- Houle G (1992) Spatial relationship between seed and seedling abundance and mortality in a deciduous forest of north-eastern North America. *J Ecol* 80: 99-108.
- Hungate BA (2006) Nitrogen cycling during seven years of atmospheric CO₂ enrichment in a scrub oak woodland. *Ecology* 87: 26.
- Hungate BA, Dukes JT, Shaw MR, Luo Y, Field CB (2003) Nitrogen and climate change. *Science* 302: 1512-1513.
- Hunter AF, Aarssen LW (1988) Plants helping plants. *BioSci* 38: 34-40.
- Hurd TM., Schwintzer CR (1996) Formation of cluster roots in *Alnus incana* ssp. *rugosa* and other *Alnus* species. *Can J Bot* 74: 1684-1686.
- Hurd TM, Raynal DJ, Schwintzer CR (2001) Symbiotic N₂ fixation of *Alnus incana* ssp. *rugosa* in shrub wetlands of the Adirondack Mountains, New York, USA. *Oecologia* 126: 94-103.
- Huss-Danell K (1978) Nitrogenase activity measurements in intact plants of *Alnus incana*. *Physiol Plant* 43: 372-376.
- Huss-Danell K (1990) The physiology of actinorhizal nodules. In: The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Schwintzer CR, Tjepkema JD (eds.) Academic Press, Inc., Tokyo, pp 129-156.
- Huss-Danell K (1997) Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *New Phytol* 136: 375-405.
- Huss-Danell K, Hahlin A-S (1988) Nitrogenase activity decay and energy supply in *Frankia* after addition of ammonium to the host plant *Alnus incana*. *Physiol Plant* 74: 745-751.
- Huss-Danell K, Sellstedt A (1983) Nitrogenase activity in response to restricted shoot growth in *Alnus incana*. *Can J Bot* 61: 2949-2955.
- Huss-Danell K, Lundquist PO, Ohlsson H (1992a) *Alnus incana* in field: nitrogen fixation, and distribution of biomass and nitrogen among plant parts and soil nitrogen. *Acta Oecologica* 13: 506.
- Huss-Danell K, Lundquist PO, Ohlsson H (1992b) N₂ fixation in a young *Alnus incana* stand, based on seasonal and diurnal variation in whole plant nitrogenase activity. *Can J Bot* 70: 1537-1544.
- Hyvönen R, Ågren GI, Linder S, Persson T, Cotrufo F, Ekblad A, Freeman M, Grelle A, Janssens IA, Jarvis PG,

- Kellomäki S, Lindroth A, Loustau D, Lundmark T, Norby RJ, Oren R, Pilegaard K, Ryan MG, Sigurdsson BD, Stromgren M, van Oijen M, Wallin G (2007) The likely impact of elevated [CO₂], nitrogen deposition, increased temperature and management on carbon sequestration in temperate and boreal forest ecosystems: a literature review. *New Phytol* 173: 463-480.
- Ingestad T (1981) Nutrition and growth of birch and grey alder seedlings in low conductivity solutions and at varied relative rates of nutrient addition. *Physiol Plant* 52: 454-466.
- IPCC (2007) Climate change 2007: synthesis report. Contribution of working group I, II and III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Core writing team, Pachauri RK, Reisinger A (eds.) Geneva, Switzerland.
- Ishizuka M, Toyooka H, Osawa A, Kushima H, Kanazawa Y, Sato A (1998) Secondary succession following catastrophic windthrow in a boreal forest in Hokkaido, Japan: the timing of the tree establishment. *J Sustain For* 6: 367-388.
- Israel DW (1987) Investigation of the role of phosphorus in symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiol* 84: 835-840.
- Iwatsubo G (1996) *Forest Ecology*. Buneido Publisher Ltd., Tokyo, pp 306 (in Japanese).
- Jacob J, Greitner C, Drake BG (1995) Acclimation of photosynthesis in relation to Rubisco and non-structural carbohydrate contents and *in situ* carboxylase activity in *Scirpus olneyi* grown at elevated CO₂ in the field. *Plant Cell Environ* 18: 875-884.
- Johnson DW (2006) Progressive N limitation in forest: review and implications for long-term responses to elevated CO₂. *Ecology* 87(1): 64-75.
- Johnson RA, Willson MF, Thompson JN, Bertin RI (1985) Nutritional values of wild fruits and consumption by migrant birds. *Ecology* 66: 819-827.
- Jordan DB, Ogren WL (1984) The CO₂/O₂ specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 161: 308-313.
- Kabeya D, Sakai A, Matsui K, Sakai S (2003) Resprouting ability of *Quercus crispula* seedlings depends on the vegetation cover of their microhabitats. *J Plant Res* 116: 207-216.
- Kaelke CM, Dawson JO (2003) Seasonal flooding regimes influence survival, nitrogen fixation, and the partitioning of nitrogen and biomass in *Alnus incana* ssp. *rugosa*. *Plant Soil* 254: 167-177.
- Karizumi N (1979) *Illustration of tree roots*. Seibunndo Sinkousya Publisher Ltd., Tokyo, pp 1121 (in Japanese).

- Kasai M (2008) Regulation of leaf photosynthetic rate correlating with leaf carbohydrate status and activation state of Rubisco under variety of photosynthetic source/sink balances. *Physiol Plant* 134: 216-226.
- Kasurinen A, Peltonen P, Julkunen-Tiitto R, apaavuori E, Nuutinen V, Holopainen T, Holopainen J (2007) Effects of elevated CO₂ and O₃ on leaf litter phenolics and subsequent performance of litter-feeding soil macrofauna. *Plant Soil* 292: 25-43.
- Katsuta M, Mori T, Yokoyama T (1998) Seeds of woody plants in Japan. Angiospermae. Japan Forest Tree Breeding Association, Tokyo, Japan. 410 pp (in Japanese).
- Kauder F, Ludewig F, Heineke D (2000) Ontogenetic changes of potato plants during acclimation to elevated CO₂. *J Exp Bot* 51: 429-437.
- Keeney DR, Nelson DW (1982) Nitrogen-inorganic forms. In: Methods of soil analysis. Part 2. Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds.) Am Soc Agr, Madison, Wis Agron Monogr 9, pp 643-698.
- Khan FN, Lukac M, Turner G, Godbold DL (2008) Elevated atmospheric CO₂ changes phosphorus fractions in soils under a short rotation poplar plantation (EuroFACE). *Soil Biol Biochem* 40: 1716-1723.
- Khan FN, Lukac M, Miglietta F, Khalid M, Godbold DL (2010) Tree exposure to elevated CO₂ increases availability of soil phosphorus. *Pak J Bot* 42(2): 907-916.
- Kikuzawa K (1978) Emergence, defoliation and longevity of alder (*Alnus hirsuta* Turcz.) leaves in a deciduous hardwood forest stand. *Jap J Ecol* 28: 299-306.
- Kikuzawa K (1980) Why do alder leaves fall in summer? *J J Ecol* 30(4): 359-368.
- Kikuzawa K (1983) Leaf survival of woody plants in deciduous broad-leaved forests. 1. Tall trees. *Canadian Journal of Botany*. 61: 2133-2139.
- Kikuzawa K, Asai T, Higashiura Y (1979) Leaf production and the effect of defoliation by the larval population of the winter moth, operophtera brumata L. in an alder (*Alnus inokumae* MURAI et KUSAKA) stand. *J J Ecol* 29: 111-120.
- Killingbeck K (1996) Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology* 77(6): 1716-1727.
- King JS, Pregitzer KS, Zak DR., Kubiske ME, Ashby JA, Holmes WE (2001a) Chemistry and decomposition of litter from *Populus tremuloides* Michaux grown at elevated atmospheric CO₂ and varying N availability. *Global Change Biol* 7: 65-74.
- King JS, Pregitzer KS, Zak DR, Kubiske ME, Holmes WE (2001b) Correlation of foliage and litter chemistry of

- sugar maple, *Acer saccharum*, as affected by elevated CO₂ and varying N availability, and effects on decomposition. *Oikos* 94: 403-416.
- Kitao M, Lei TT, Koike T, Tobita H, Maruyama Y (2003) Higher electron transport rate observed at low intercellular CO₂ concentration in long-term drought-acclimated leaves of Japanese mountain birch (*Betula ermanii* Cham.). *Physiol Plant* 118: 406-413.
- Kitao M, Lei TT, Koike T, Kayama M, Tobita H, Maruyama Y (2007) Interaction of drought and elevated CO₂ on photosynthetic down-regulation and susceptibility to photoinhibition in Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) seedlings grown under limited N availability. *Tree Physiol* 27(5): 727-735.
- Koerselman W, Meuleman AFM (1996) The vegetation N:P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *J Applied Ecol* 33(6): 1441-1450.
- Kogawara S, Norisada M, Tange T, Yagi H, Kojima K (2006) Elevated atmospheric CO₂ concentration alters the effects of phosphate supply on growth of Japanese red pine (*Pinus densiflora*) seedlings. *Tree Physiol* 26: 25-33.
- Koike T (1988) Leaf structure and photosynthetic performance as related to the forest succession of deciduous broad-leaved trees. *Plant Species Biol* 3: 77-87.
- Koike T (2004) *Tree Physiological Ecology*. Asakura Publisher Ltd., Tokyo, pp.151. (in Japanese).
- Koike T, Izuta T, Lei TT, Kitao M, Asanuma S (1997) Effects of high CO₂ on nodule formation in roots of Japanese mountain alder seedlings grown under two nutrient levels. In: *Plant nutrition - for sustainable food production and environment*. Ando T, Fujita K, Mae T, Matsumoto H, Mori S, Sekiya J (eds.) Kluwer Academic Publishers. Japan, pp 887-888.
- Koike T, Tobita H, Shibata T, Mastuki S, Konno K, Kitao M, Yamashita N, Maruyama Y (2006) Defense characteristics of deciduous broad-leaved tree seedlings grown under factorial combination of two levels of CO₂ and nutrients. *Popul Ecol* 48: 23-29.
- Körner C (2003) Nutrients and sink activity drive plant CO₂ responses-caution with literature-based analysis. *New Phytol* 159: 537-538.
- Körner C (2006) Plant CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. *New Phytol* 172: 393-411.
- Kramer PJ, Kozlowski TT (1979) *Physiology of woody plants*. Academic Press, New York. 811 pp.
- Krause GH (1994) Photoinhibition induced by low temperatures. In: *Photoinhibition of Photosynthesis from*

- Molecular Mechanisms to the Field. Baker NR, Bowyer JR (eds.) Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 331-348.
- Kurdai F, Domenach A-M, Bouvarel L, Moiround A (1993) Field comparison of $\delta^{15}\text{N}$ values and growth of alder provenances and species. *Soil Sci Plant Nutr* 39(4): 635-643.
- Lajtha K (1987) Nutrient resorption efficiency and the response to phosphorus fertilization in the desert shrub *Larrea tridentata* (DC) Cov. *Biogeochem* 4: 265-276.
- Lambers H, Chapin III FS, Pons T (1998) *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lee YY, Son Y (2005) Diurnal and seasonal patterns of nitrogen fixation in an *Alnus hirsuta* plantation of central Korea. *J Plant Biol* 48 (3): 332-337.
- Leuschner C, Hertel D, Coner H, Buttner V (2001) Root competition between beech and oak: a hypothesis. *Oecologia* 126: 276-284.
- Lewis JD, Strain BR (1996) The role of mycorrhizas in the response of *Pinus taeda* L. seedlings to elevated CO_2 . *New Phytol* 133: 431-443.
- Lewis JD, Wang XZ, Griffin KL, Tissue DT (2002) Effects of age and ontogeny on photosynthetic responses of determinate annual plant to elevated CO_2 concentrations. *Plant Cell Environ* 25: 359-368.
- Lewis JD, Ward JK, Tissue DT (2010) Phosphorus supply drives nonlinear responses of cottonwood (*Populus deltoides*) to increases in CO_2 concentration from glacial to future concentrations. *New Phytol* 187: 438-448.
- Lindroth RL (2010) Impact of elevated atmospheric CO_2 and O_3 on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *J Chem Ecol* 36: 2-21.
- Liu LL, King JS, Giardina CP (2005) Effects of elevated atmospheric CO_2 and tropospheric O_3 on leaf litter production and chemistry in trembling aspen and paper birch ecosystems. *Tree Physiol* 15: 1511-1522.
- Liu LL, King JS, Giadina CP (2007) Effects of elevated atmospheric CO_2 and tropospheric O_2 on nutrient dynamics: decomposition of leaf litter in trembling aspen and paper birch communities. *Plant Soil* 299: 65-82.
- Liu LL, King JS, Booker FL, Giardina CP (2009) Enhanced litter input rather than changes in litter chemistry drive soil carbon and nitrogen cycles under elevated CO_2 : a microcosm study. *Global Change Biol* 15(2): 441-453.
- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR (2004) Riding atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Ann Rev Plant Biol* 55: 591-628.

- Lotwick HM, Silverman BW (1982) Methods for analysing spatial processes of several types of points. *J Royal Statistical Soc Series B-methodological* 44: 406-413.
- Lousier JD, Parkinson D (1978) Chemical-element dynamics in decomposing leaf litter. *Can J Bot* 56: 2795-2812.
- Lovett GM, Ruesink AE (1995) Carbon and nitrogen mineralization from decomposing gypsy-moth frass. *Oecologia* 104: 133-138.
- Lundquist P-O, Huss-Danell K (1991) Responses of nitrogenase to altered carbon supply in a *Frankia-Alnus incana* symbiosis. *Physiol Plant* 83: 331-338.
- Lundquist P-O, Näsholm T, Huss-Danell K (1993) Nitrogenase activity and root nodule metabolism in response to O₂ and short-term N₂ deprivation in dark-treated *Frankia-Alnus incana* plants. *Physiol Plant* 119: 244-252.
- Luo Y, Field CB, Mooney HA (1994) Predicting responses of photosynthesis and root fraction to elevated [CO₂]: interactions among carbon, nitrogen, and growth. *Plant Cell Environ* 17: 1195-1204.
- Luo Y, Su B, Currie WS, Dukes JS, Finzi A, Hartwig U, Hungate B, McMurtrie RE, Oren R, Parton WJ, Pataki DE, Shaw MR, Zak DR, Field CB (2004) Progressive nitrogen limitation of ecosystem responses to rising atmospheric carbon dioxide. *BioScience* 54(8): 731-739.
- Mae T (2004) Leaf senescence and nitrogen metabolism. In: *Plant Cell Death Process*. Noodén LD (ed.) Elsevier Academic Press, pp 157-168.
- Makino A, Harada M, Sato T, Nakano H, Mae T (1997) Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiol* 115: 199-203.
- Maltez-Mouro S, Garcia LV, Maranon T, Freitas H (2007) Recruitment patterns in a mediterranean oak forest: a case study showing the importance of the spatial component. *Forest Sci* 53(6): 645-652.
- Martin KJ, Posavatz NJ, Myrold DD (2003) Nodulation potential of soils from red alder stands covering a wide age range. *Plant Soil* 254: 187-192.
- Masaki T, Suzuki W, Niyama K, Iida S, Tanaka H, Nakashizuka T (1992) Community structure of a species-rich temperate forest, Ogawa Forest Reserve, central Japan. *Vegetatio* 98: 97-111.
- McCarthy HR, Oren R, Johnsen KH, Gallet-Budynek A, Pritchard SG, Cook CW, LaDeau SL, Jackson RB, Finzi AC (2010) Re-assessment of plant carbon dynamics at the Duke free-air CO₂ enrichment site: interactions of atmospheric [CO₂] with nitrogen and water availability over stand development. *New Phytol*

185(2): 514–528.

McNabb DH, Geist JM (1979) Acetylene reduction assay of symbiotic N₂ fixation under field conditions. *Ecology* 60(5): 1070-1072.

Medlyn, BE, Badeck, FW, Pury DGG, Barton CVM, Broadmeadow M, Ceulemans R, De Angelis P, Forstreuter M, Jach ME, Kellomäki S, Laitat E, Philippot S, Rey A, Strassemyer J, Laitinen K, Liozon R, Porter B, Robermtz P, Wang K, Jarvis PG (1999) Effects of elevated [CO₂] on photosynthesis in European forest species: a meta-analysis of model parameters. *Plant Cell Environ* 22: 1475-1495.

Meehan TD, Lindroth RL (2007) Modeling nitrogen flux by larval insect herbivores from a temperate hardwood forest. *Oecologia* 153: 833-843.

Miller A, Tsai C-H, Hemphill D, Endres M, Rodermel S, Spalding M (1997) Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny. *Plant Physiol* 115: 1195-1200.

Millikin CS, Bledsoe CS (1999) Biomass and distribution of fine and coarse roots from blue oak (*Quercus douglasii*) trees in the northern Sierra Nevada foothills of California. *Plant Soil* 214: 27-38.

Minchin FR, Witty JF, Sheehy JE, Muller M (1983) A major error in the acetylene reduction assay: Decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J Exp Bot* 34: 641-649.

Minchin FR, Sheehy JE, Witty JF (1986) Further errors in acetylene reduction assay: Effects of plant disturbance. *J Exp Bot* 37: 1581-1591.

Moore BD, Cheng SH, Sims D, Seemann JR (1999) The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ* 22: 567-582.

Murai S (1964) Phytotaxonomical and geobotanical studies on genus *Alnus* in Japan (III). Taxonomy of whole world species and distribution of each section. *Bull Gov Forest Exp Sta (Tokyo, Japan)*. 171: 1-107.

Murai S (1968) Relationships of allied species between northwestern U.S.A. and Japan on the genus *Alnus*. In: Trappe JM, Franklin JF, Tarrant RF, Hansen GM (eds.) *Biology of alder*. U.S. Dep. Agric., For. Serv., Pacific Northwest For. Range Exp. St., Portland, Oregon, pp 23-36.

Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.

Myrold DD, Huss-Danell K (2003) Alder and lupine enhance nitrogen cycling in a degraded forest soil in Northern Sweden. *Plant Soil* 254: 47-56.

Nakanishi H (1996) Fruit color and fruit size of bird-disseminated plants in Japan. *Vegetatio* 123: 207-218.

- Nanami S, Kawaguchi H, Yamakura T (1999) Dioecy-induced spatial patterns of two codominant tree species, *Podocarpus nagi* and *Neolitsea aciculata*. *J Ecol* 87: 678-687.
- Naumburg E, Loik ME, Smith SD (2004) Photosynthetic responses of *Larrea tridentate* to seasonal temperature extremes under elevated CO₂. *New Phytol* 162: 323-330.
- Navarro E, Bousquet J, Moiroud A, Munive A, Piou D, Normand P (2003) Molecular phylogeny of *Alnus* (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant Soil* 254: 207-217.
- Nie GY, Hendrix DL, Webber AN, Kimball BA, Long SP (1995a) Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO₂ concentration in the field. *Plant Physiol* 108: 975-983.
- Nie GY, Long SP, Garcia RL, Kimball BA, LaMorte RL, Pinter PJ, Wall GW, Webber AN (1995b) Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant Cell Environ* 18: 855-864.
- Niinemets Ü (1997) Distribution patterns of foliar carbon and nitrogen as affected by tree dimensions and relative light conditions in the canopy of *Picea abies*. *Trees* 11: 144-154.
- Niinemets Ü, Tenhunen JD (1997) A model separating leaf structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. *Plant Cell Environ* 20: 845-866.
- Niinemets Ü, Tenhunen JD (2004) Within-canopy variation in the rate of development of photosynthetic capacity is proportional to integrated quantum flux density in temperate deciduous trees. *Plant Cell Environ* 27: 293-313
- Norby RJ (1987) Nodulation and nitrogenase activity in nitrogen-fixing woody plants stimulated by CO₂ enrichment of the atmosphere. *Physiol Plant* 71: 77-82.
- Norby RJ, Iversen CM (2006) Nitrogen uptake, distribution, turnover, and efficiency of use in a CO₂-enriched sweetgum forest. *Ecology* 87(1): 5-14.
- Norby RJ, Wullschlegel SD, Gunderson CA, Johnson DW, Ceulemans R (1999) Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. *Plant Cell Environ* 22: 683-714.
- Norby RJ, Long TM, Hartz-Rubin JS, O'Neill EG (2000) Nitrogen resorption in senescing tree leaves in a warmer, CO₂-enriched atmosphere. *Plant Soil* 224: 15-29.
- Norby RJ, Cotrufo MF, Ineson P, O'Neill EG, Canadell JG (2001) Elevated CO₂, litter chemistry, and decomposition: A synthesis. *Oecologia* 127: 153-165.

- Nord EA, Lynch JP (2009) Plant phenology: a critical controller of soil resource acquisition. *J Exp Bot* 60(7): 1927-1937.
- Nordell KO, Karlsson PS (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.
- Nowak RS, Ellsworth DS, Smith SD (2004) Functional responses of plants to elevated atmospheric CO₂ – do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytol* 162: 253-280.
- Okabe H (2002) Dynamics of ectomycorrhizas and actinorhizal associations. *Ecol Studies* 158: 273-284.
- Olson JS (1963) Energy storage and the balance of producers and decomposition in ecological systems. *Ecology* 44: 322-331.
- O'Neill EG, Norby RJ (1996) Litter quality and decomposition rates of foliar litter produced under CO₂ enrichment. In: Koch GW, Mooney HA (eds.) *Carbon dioxide and terrestrial ecosystems*. Academic Press, San Diego, pp 87-103.
- Onoda Y, Hikosaka K, Hirose T (2004) Allocation of nitrogen to cell walls decreases photosynthetic nitrogen use efficiency. *Funct Ecol* 18: 419-425.
- Osborne CP, LaRoche J, Garcia RL, Kimball BA, Wall GW, Pinter Jr PJ, LaMorte RL, Hendrey GR, Long SP (1998) Does leaf position within a canopy affect acclimation of photosynthesis to elevated CO₂? Analysis of a wheat crop under free-air CO₂ enrichment. *Plant Physiol* 117: 1037-1045.
- Osono T, Takeda H (2004) Accumulation and release of nitrogen and phosphorus in relation to lignin decomposition in leaf litter of 14 tree species. *Ecol Res* 19: 593-602.
- Parker GG (1983) Throughfall and stemflow in the forest nutrient cycle. *Adv Ecol Res* 13: 57-133.
- Parsons R, Stanforth A, Raven JA, Sprent JI (1993) Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant Cell Environ* 16: 125-136.
- Parsons WFJ, Lindroth RI, Bockheim JG (2004) Decomposition of *Betula papyrifera* leaf litter under the independent and interactive effects of elevated CO₂ and O₃. *Global Change Biol* 10: 1666-1677.
- Parsons WFJ, Bockheim JG, Lindroth RL (2008) Independent, interactive, and species-specific responses of leaf litter decomposition to elevated CO₂ and O₃ in a northern hardwood forest. *Ecosystems* 11: 505-519.
- Pawlowski N, Newton WE (2008) *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 310 pp.

- Peterson CJ., Squires ER (1995) An unexpected change in spatial pattern across 10 years in an aspen-white-pine forest. *J Ecol* 83: 847-855.
- Pizelle G (1984) Seasonal variations of the sexual reproductive growth and nitrogenase activity (C_2H_2) in mature *Alnus glutinosa*. *Plant Soil* 78: 181-188.
- Pugnaire FI, Chapin FS III (1993) Controls over nutrient resorption from leaves of evergreen mediterranean species. *Ecology* 74: 124-129.
- Qaderi MM, Kurepin LV, Reid DM (2006) Growth and physiological responses of canola (*Brassica napus*) to three components of global climate change: temperature, carbon dioxide and drought. *Physiol Plant* 128: 710-721.
- Randlett DL, Zak DR, Pregitzer KS, Curtis PS (1996) Elevated atmospheric CO_2 and leaf litter chemistry: influences on microbial respiration and net N mineralization. *Soil Sci Soc Am J* 60: 1571-1577.
- Reddell P, Rosbrook PA, Bowen GD, Gwaze D (1988) Growth responses in *Casuarina cunninghamiana* plantings to inoculation with *Frankia*. *Plant Soil* 108: 79-86.
- Reekie EG (1996) The effect of elevated CO_2 on developmental processes and its implication for plant-plant interactions. In: *Carbondioxide, populations, and communities*. Körner C, Bazzaz FA (eds.) Academic Press, Inc, Toronto, Ont. pp 333-346.
- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS (1997) From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceeding of the National Academy of Science, USA* 94: 13730-13734.
- Reich PB, Hobbie SE, Lee T, Ellsworth DS, West JB, Tilman D, Knops JMH, Naeem S, Trost J (2006) Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO_2 . *Nature* 440: 922-925.
- Rhoades C, Oskarsson H, Binkley D, Stottlemeyer B (2001) Alder (*Alnus crispa*) effects on soils in ecosystems of the Agashashok River valley, northwest Alaska. *Ecoscience* 8: 89-95.
- Ripley BD (1977) Modeling spatial patterns. *J Roy Stat Soc B* 39: 172-212.
- Rogers A, Ainsworth EA (2006) The response of foliar carbohydrates to elevated carbon dioxide concentration. In: *Managed Ecosystems and CO_2 . Case Studies, Processes and Perspectives*. Nörsberger J, Long SP, Norby RJ, Stitt M, Hendrey GR, Blum H (eds.) Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 293-308.
- Rogers A, Fischer BU, Bryant J, Frehner M, Blum H, Raines CA, Long SP (1998) Acclimation of photosynthesis to elevated CO_2 under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilization. Perennial ryegrass under free air CO_2 enrichment. *Plant Physiol* 118: 683-689.

- Russo RO (1989) Evaluating alder-endophyte (*Alnus acuminata* - *Frankia* - Mycorrhizae) interactions. *Plant Soil* 118: 151-155.
- Rytter L (1989) Distribution of roots and root nodules and biomass allocation in young intensively managed gray alder stands on a peat bog. *Plant Soil* 119: 71-79.
- Rytter L, Arveby AS, Granhall U (1991) Dinitrogen (C₂H₂) fixation in relation to nitrogen fertilization of gray alder [*Alnus incana* (L.) Moench.] plantations in a peat bog. *Biol Fertil Soils* 10: 233-240.
- Sakai Y, Takahoshi M, Tanaka N (2007) Root biomass and distribution of a *Picea-Abies* stand and a *Larix-Betula* stand in pumiceous Entisol in Japan. *J For Res* 12: 120-125.
- Sanboen P, Preston C, Brockley R (2002) N₂-fixation by Sitka alder in a young lodgepole pine stand in central interior British Columbia, Canada. *For Ecol Manage* 167: 223-231.
- SAS Institute (2003) JMP: statistics and graphics guide, version 5.1. SAS Institute, Cary, NC, 792 pp.
- Sasakawa H (1995) Effect of *Frankia* inoculation on growth and nitrogen-fixing activity of *Myrica rubra* seedlings prepared aseptically. *Soil Sci Plant Nutr* 41(4): 691-698.
- Schoenau JJ, O'Halloran IP (2008) Sodium bicarbonate-extractable phosphate. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Second Edition. Carter MR, Gregorich EG (eds.) CRC, pp 89-94.
- Schortemeyer M, Atkin OK, McFarlane N, Evans JR (1999) The impact of elevated atmospheric CO₂ and nitrate supply on growth, biomass allocation, nitrogen partitioning and N₂ fixation of *Acacia melanoxylon*. *Aust J Plant Physiol* 26: 737-747.
- Schwintzer CR, Tjepkema JD (1994) Factors affecting the acetylene to ¹⁵N₂ conversion ratio in root nodules of *Myrica gale* L. *Plant Physiol* 106: 1041-1047.
- Schwintzer CR, Tjepkema JD (1997) Field nodules of *Alnus incana* ssp. *rugosa* and *Myrica gale* exhibit pronounced acetylene-induced declines in nitrogenase activity. *Can J Bot* 75: 1415-1423.
- Schwintzer CR, Berry AM., Disney LD (1982) Seasonal patterns of root nodule growth, endophyte morphology, nitrogenase activity, and shoot development in *Myrica gale*. *Can J Bot* 60: 746-757.
- Seiler JR, Johnson JD (1984) Growth and acetylene reduction of black alder seedlings in response to water stress. *Can J For Res* 14: 477-480.
- Sharma E (1993) Nutrient dynamics in Himalayan alder plantation. *Ann Bot* 72: 329-336.
- Sharma E, Ambasht RS (1984) Seasonal variation in nitrogen fixation by different ages of root nodules of *Alnus nepalensis* plantation, in the eastern Himalayas. *J Appl Ecol* 21: 265-270.

- Sharma E, Ambasht RS (1986) Root nodule age-class transition, production and decomposition in an age sequence of *Alnus nepalensis* plantation stands in the eastern Himalayas. *J Appl Ecol* 23: 689-701.
- Sharma E, Ambasht RS (1987) Litterfall, decomposition and nutrient release in an age sequence of *Alnus nepalensis* plantation stands in the eastern Himalaya. *J Ecol* 75: 997-1010.
- Sharma E, Ambasht RS (1988) Nitrogen accretion and its energetics in the Himalayan alder. *Funct Ecol* 2: 229-235.
- Sharma G, Sharma R, Sharma E, Singh KK (2002) Performance of age series of *Alnus*-cardamom plantation in the Sikkim Himalaya: nutrient dynamics. *Ann Bot* 89: 273-282.
- Sharma G, Sharma R, Sharma E (2008) Influence of stand age on nutrient and energy release through decomposition in alder-cardamom agroforestry systems of the Eastern Himalayas. *Ecol Res* 23: 99-106.
- Sharma G, Sharma R, Sharma E (2009) Impact on stand age on soil C, N and P dynamics in a 40-year chronosequence of alder-cardamom agroforestry of the Sikkim Himalayas. *Pedobiol* 52: 401-414.
- Sharma G, Sharma R, Sharma E (2010) Impact of altitudinal gradients on energetics and efficiencies of N₂-fixation in alder-cardamom agroforestry systems of the eastern Himalayas. *Ecol Res* 25: 1-12.
- Shaver GR, Chapin FS III (1991) Production: biomass relationships and element cycling in contrasting arctic vegetation types. *Ecol Monog* 61: 1-31.
- Shearer G, Kohl DH (1993) Natural abundance of $\delta^{15}\text{N}$: fractional contribution of two sources to a common sink and use of isotope discrimination. In: Knowles R, Blackburn TH (eds.) *Nitrogen isotope techniques*. San Diego, CA, Academic Press, pp 89-135.
- Sicher RC, Bunce JA (1997) Relationship of photosynthetic acclimation to changes of Rubisco activity in field-grown winter wheat and barley during growth in elevated carbon dioxide. *Photosynthesis Res* 52: 27-38.
- Silvester WB (1983) Analysis of nitrogen fixation. In: Gordon JC, Wheeler CT (eds.) *Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: Foundation and applications*. Nihoff/Dr. W. Junk, The Hague, pp 173-212.
- Somogo M (1985) Cytogenetic studies in the subgenus *Alnuster* of the genus *Alnus*. Japan Forest Tree Breeding Association, Tokyo, 132 pp (in Japanese).
- Son Y, Lee YY, Lee CY, Yi MJ (2007) Nitrogen fixation, soil nitrogen availability, and biomass in pure and mixed plantations of alder and pine in central Korea. *J Plant Nutri* 30: 1841-1853.
- Spreitzer RJ (1999) Questions about the complexity of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Photosynthesis Res* 60: 29-42.

- Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ* 22: 583-621.
- Strain BR, Bazzaz FA (1983) Terrestrial plant communities. In: CO₂ and Plants. Lemon ER (ed) Westview Press, Boulder, CO, pp 177-222.
- Sundström K-R, Huss-Danell K (1987) Effects of water stress on nitrogenase activity in *Alnus incana*. *Physiol Plant* 70: 342-348.
- Tadaki Y, Mori H, Mori S (1987) Studies on the production structure of forests (XX) Primary productivity of a young alder stand. *J J For Soc* 69: 207-214 (in Japanese).
- Takashima T, Hikosaka K, Hirose T (2004) Photosynthesis or persistence: nitrogen allocation in leaves of evergreen and deciduous *Quercus* species. *Plant Cell Environ* 27: 1047-1054.
- Takeda H (1998) Decomposition processes of litter along a latitudinal gradient. In : Environmental forest science. Sassa K (ed.) Kluwer, Dordrecht, pp 197-206.
- Tanouchi H, Yamamoto S (1995) Structural and regeneration of canopy species in an old-growth evergreen broad-leaved forest in Aya district, southwestern Japan. *Vegetatio* 117: 51-60.
- Tateno M (2003) Benefit to N₂-fixing alder of extending growth period at the cost of leaf nitrogen loss without resorption. *Oecologia* 137: 338-343.
- Tateno R, Hishi T, Takeda H (2004) Above- and belowground biomass and net primary production in a cool-temperate deciduous forest in relation to topographical changes in soil nitrogen. *For Ecol Manage* 193: 297-306.
- Tateno R, Tokuchi N, Yamanaka N, Du S, Otsuki K, Shimamura T, Xue Z, Wang S, Hou Q (2007) Comparison of litterfall production and leaf litter decomposition between an exotic black locust plantation and an indigenous oak forest near Yan'an on the Loess Plateau, China. *For Ecol Manage* 241: 84-90.
- Taylor BR, Parkinson D, Parsons WF (1989a) A microcosm test of nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates. *Eology* 70(1): 97-104.
- Taylor BR, Parsons WFJ, Parkinson D (1989b) Decomposition of *Populus tremuloides* leaf litter accelerated by addition of *Alnus crispa* litter. *Can J For Res* 19: 674-679.
- Temperton VM, Grayston SJ, Jackson G, Barton CVM, Millard P, Jarvis PG (2003) Effects of elevated carbon dioxide concentration on growth and nitrogen fixation in *Alnus glutinosa* in a long-term field experiment. *Tree Physiol* 23: 1051-1059.

- Thomas BD, Bowman WD (1998) Influence of N₂-fixing *Trifolium* on plant species composition and biomass production in alpine tundra. *Oecologia* 115: 26-34.
- Thomas RB, Bashkin MA, Richter DD (2000) Nitrogen inhibition of nodulation and N₂ fixation of a tropical N₂-fixing tree (*Gliricidia sepium*) grown in elevated atmospheric CO₂. *New Phytol* 145: 233-243.
- Tissue DT, Megonigal JP, Thomas RB (1997) Nitrogenase activity and N₂ fixation are stimulated by elevated CO₂ in a tropical N₂-fixing tree. *Oecologia* 109: 28-33.
- Tjepkema JD, Winship LJ (1988) Time course of acetylene reduction in nodules of five actinorhizal genera. *Plant Physiol* 86: 581-583.
- Tjepkema JD, Schwintzer CR, Benson DR (1986) Physiology of actinorhizal nodules. *Annu Rev Plant Physiol* 37: 209-232.
- Tobita H, Enoki T, Kawaguchi H (1993) Effects of site conditions on natural regeneration in a *Pinus Thunbergii* plantation on Mt. Tanakami. *Bulletin of the Kyoto University Forest* 65: 50-62 (in Japanese).
- Tobita H, Kitao M, Koike T, Maruyama Y (2005) Effects of elevated CO₂ and Nitrogen availability on nodulation of *Alnus hirsuta* Turcz. *Phyton* 45: 125-131.
- Tobita H, Uemura A, Kitao M, Kiaoka S, Utsugi H (2008) The effects of elevated CO₂, low phosphorus supply, and drought on photosynthetic activity of *Alnus hirsuta* (Turcz.). *Trans Mtg Hokkaido Br Jpn For Soc* 56: 43-45 (in Japanese).
- Tobita H, Uemura A, Kitao M, Kiaoka S, Utsugi H (2010) Interactive effects of elevated CO₂, phosphorus deficiency, and soil drought on nodulation and nitrogenase activity in *Alnus hirsuta* and *Alnus maximowiczii*. *Symbiosis* 50: 59-69.
- Torrey JG, Berg RH (1988) Some morphological features for genetic characterization among Casuarinaceae. *Am J Bot* 75: 864-874.
- Townsend AR, Cleveland CC, Asner GP, Bustamante MMC (2007) Controls over foliar N:P ratios in tropical rain forests. *Ecology* 88(1): 107-118.
- Tripp LN, Bezdicsek DF, Heilman PE (1979) Seasonal and diurnal patterns and rates of nitrogen fixation by young red alder. *Forest Sci* 25(2): 371-380.
- Tsutsumi H, Nakatsubo T, Ino Y (1993) Field measurements of nitrogen-fixing activity of intact saplings of *Alnus maximowiczii* in the subalpine zone of Mt Fuji. *Ecol Res* 8: 85-92.
- Tsutsumi T (1989) *Forest Ecology*. Asakura Publisher Ltd., Tokyo, pp 166 (in Japanese).

- Uemura A, Tobita H, Kitaoka S, Utsugi H (2009) Effects of high CO₂ concentration on water relations of two *Alnus* species. *Trans. Mtg Hokkaido Br Jpn For Soc* 57: 195-197 (in Japanese).
- Uemura S, Sato T (1975) Takahashi H (ed.) In: *JIBPSynthesis*. Volume 12. Nitrogen fixation and nitrogen cycle. Univ. of Tokyo Press, pp 17.
- Uliassi DD, Ruess RW (2002) Limitation to symbiotic nitrogen fixation in primary succession on the Tanana river floodplain. *Ecology* 83: 88-103.
- Uliassi DD, Huss-Danell K, Ruess RW, Doran K (2000) Biomass allocation and nitrogenase activity in *Alnus tenuifolia*: responses to successional soil type and phosphorus availability. *Ecoscience* 7: 73-79.
- Urban O, Pokorny R, Kalina J, Marek MV (2003) Control mechanisms of photosynthetic capacity under elevated CO₂ concentration: evidence from three experiments with Norway spruce trees. *Photosynthetica* 41(1): 69-75.
- Valverde C, Wall LG (2003) The regulation of nodulation, nitrogen fixation and assimilation under a carbohydrate shortage stress in the *Discaria trinervis*-*Frankia* symbiosis. *Plant Soil* 254: 155-165.
- Valverde C, Ferrari A, Wall LG (2002) Phosphorous and the regulation of nodulation in the actinorhizal symbiosis between *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* BCU110501. *New Phytol* 153: 43-52.
- Van Cleve K, Viereck LA, Schlentner RL (1971) Accumulation of nitrogen in alder (*Alnus*) ecosystems near Fairbanks, Alaska. *Arct Alp Res* 3: 101-114.
- Van Cleve K., Yarie J, Erickson R, Dymess CT (1993) Nitrogen mineralization and nitrification in successional ecosystems on the Tanana River floodplain, interior Alaska. *Can J Forest Res* 23: 970-978.
- Van Heerwaarden LM, Toet S, Aerts R (2003) Nitrogen and phosphorus resorption efficiency and proficiency in six-arctic bog species after 4 years of nitrogen fertilization. *J Ecol* 91: 1060-1070.
- Van Oosten JJ, Besford RT (1995) Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide concentrations. *Plant Cell Environ* 18: 1253-1266.
- Vitousek PM (1982) Nutrient cycling and nutrient use efficiency. *Am Nat* 4: 553-572.
- Vitousek PM, Howarth RW (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochem* 13: 87-115.
- Vitousek PM, Walker LR (1987) Colonization, succession and resource availability: ecosystem-level interactions. In: Gray AJ, Crawley MJ, Edwards PJ (eds.) *Colonization, succession and stability*. Blackwell

- Scientific, Oxford, UK, pp 207-223.
- Vitousek PM, Walker LR (1989) Biological invasion by *Myrica faya* in Hawai'i: plant demography, nitrogen fixation, ecosystem effects. *Ecol Mon* 59(3): 247-265.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WM, Tilman DG (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecol Appl* 7(3): 737-750.
- Vitousek PM, Cassman K, Cleveland C, Crew T, Field CB, Grimm NB, Howarth RW, Marino R, Martinelli L, Rastetter EB, Sprent JI (2002) Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57: 1-45.
- Vizoso S, Gerant D, Guehl JM, Joffre R, Chalot M, Gross P, Maillard P (2008) Do elevated CO₂ concentration and nitrogen fertilization alter storage and remobilization of carbon and nitrogen in pedunculate oak saplings? *Tree Physiol* 28: 1729-1739.
- Vogel CS, Curtis PS (1995) Leaf gas and nitrogen dynamics of N₂-fixing field-grown *Alnus glutinosa* under elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biol* 1: 55-61.
- Vogel JG, Gower ST (1998) Carbon and nitrogen dynamics of boreal jack pine stands with and without a green alder understory. *Ecosystems* 1: 386-400.
- Vogel CS, Curtis PS, Thomas RB (1997) Growth and nitrogen accretion of dinitrogen-fixing *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. under elevated carbon dioxide. *Plant Ecol* 130: 63-70.
- Wait DA, Jones CG, Wyum J, Woodward FI (1999) The fraction of expanding to expanded leaves determines the biomass response to *Populus* to elevated CO₂. *Oecologia* 121: 193-200
- Walker LW, Chapin III FS (1987) Interactions among processes controlling successional change. *Oikos* 50: 131-135.
- Wall LG (2000) The actinorhizal symbiosis. *J Plant Growth Regulation* 19: 167-182.
- Wall LG, Berry AM (2008) Early interactions, infection and nodulation in actinorhizal symbiosis. In: Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses. Pawlowski K, Newton WE (eds.) Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 147-166.
- Wall LG, Huss-Danell K (1997) Regulation of nodulation in *Alnus Frankia* symbiosis. *Physiol Plant* 99: 594-600.
- Wall LG, Hellsten A, Huss-Danell K (2000) Nitrogen, phosphorous, and the ratio between them affect nodulation in *Alnus incana* and *Trifolium pratense*. *Symbiosis* 29: 91-105.

- Wallace ZP, Lovett GM, Hart JE, Machona B (2007) Effects of nitrogen saturation on the tree growth and death in a mixed-oak forest. For Ecol Manage 243: 210-218.
- Wang W-Q, Wang M, Lin P (2003) Seasonal changes in element contents in mangrove element retranslocation during leaf senescence. Plant Soil, 252: 187-193.
- Wassen MJ, Venterink HO, Lapshina ED, Tanneberger F (2005) Endangered plants persist under phosphorus limitation. Nature 437: 547-550.
- Watanabe Y, Tobita H, Kitao M, Maruyama Y, Choi D, Sasa K, Funada R, Koike T (2008) Effects of elevated CO₂ and nitrogen on wood structure related to water transport in seedlings of two deciduous broad-leaved tree species. Trees 22(4): 403-411.
- Weibull W (1951) A statistical distribution function of wide applicability. J Appl Mechanics 18: 293-297.
- Wesolowski T, Rowinski P (2006) Timing of bud burst and tree-leaf development in a multispecies temperate forest. For Ecol Manage 237: 387-393.
- Wheeler CT (1971) The causation of the diurnal changes in nitrogen fixation in the nodules of *Alnus glutinosa*. New Phytol 70: 487-495.
- Wheeler CT, Cameron EM, Gordon JC (1978) Effects of handling and surgical treatments on nitrogenase activity in root nodules of *Alnus glutinosa*, with special reference to the application of indole-acetic acid. New Phytol 80: 175-178.
- Winship LJ, Tjepkema JD (1985) Nitrogen fixation and respiration by root nodules of *Alnus rubra* Bong.: Effects of temperature and oxygen concentration. Plant Soil 87: 91-107.
- Winship LJ, Tjepkema JD (1990) Techniques for measuring nitrogenase activity in Frankia and actinorhizal plants. In: The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Schwintzer CR, Tjepkema JD (eds.) Academic Press, Inc., Tokyo, pp 264-280.
- Woodrow IE (1994) Control of steady-state photosynthesis in dunflowers growing in enhanced CO₂. Plant Cell Environ 17: 277-286.
- Woodrow IE, Berry JA (1988) Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39: 533-594.
- Wright IJ, Westby M (2003) Nutrient concentration, resorption and lifespan: leaf traits of Australian sclerophyll species. Funct Ecol 17: 10-19.
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M (2001) Strategy shifts in leaf physiology, structure and nutrient content

- between species of high- and low-rainfall and high- and low-nutrient habitats. *Functional Ecol* 15(4): 423-434.
- Wurtz TL (1995) Understory alder in three boreal forests of Alaska: local distribution and effects on soil fertility. *Can J For Res* 25: 987-996.
- Xu Z, Zhou G, Wang Y (2007) Combined effects of elevated CO₂ and soil drought on carbon and nitrogen allocation of the desert shrub *Caragana intermedia*. *Plant Soil* 301(1-2): 87-97
- Yamanaka T, Li C-Y, Bormann BT, Okabe H (2003) Tripartite associations in alder: Effects of *Frankia* and *Alpova diplophloeus* on the growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of *Alnus tenuifolia*. *Plant Soil* 254: 179-186.
- Yamanaka T, Akama A, Li C-Y, Okabe H (2005) Growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of *Alnus sieboldiana* after inoculation of *Frankia* together with *Gigaspora margarita* and *Pseudomonas putida*. *J For Res* 10: 21-26.
- Yanai RD, Park BB, Hamburg SP (2006) The vertical and horizontal distribution of roots in northern hardwood stands of varying age. *Can J For Res* 36: 450-459.
- Yasumura Y, Hikosaka K, Hirose T (2006) Resource allocation to vegetative and reproductive growth in relation to mast seedlings in *Fagus crenata*. *For Ecol Manage* 229: 228-233.
- Zak DR, Holmes WE, Finzi AC, Norby RJ, Schlesinger WH (2003) Soil nitrogen cycling under elevated CO₂: a synthesis of forest FACE experiments. *Ecol Appl* 13(6): 1508-1514.
- Zanetti S, Hartwig UA, Nosberger J (1998) Elevated atmospheric CO₂ does not affect *per se* the preference for symbiotic nitrogen as opposed to mineral nitrogen of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ* 21: 623-63
- Zavitkovski J, Newton M (1972) Primary productivity of red alder ecosystems. *Ecology* 53: 235-242.
- Zitzer SF, Dawson JO (1992) Soil properties and actinorhizal vegetation influence nodulation of *Alnus glutinosa* and *Elaeagnus angustifolia* by *Frankia*. *Plant Soil* 140: 197-204.
- Zobel RW, Kinraide TB, Baligar VC (2007) Fine root diameters can change in response to changes in nutrient concentration. *Plant Soil* 297: 243-354.

要旨

第2章

2. 1節

窒素固定樹種であるケヤマハンノキの根粒バイオマスを推定するために、岐阜県高山市の、林道工事により攪乱を受けた立地に天然更新した約 18 年生のヤマハンノキ林分において、樹木個体の根粒の分布と根粒のサイズ構造を調べた。6 月から 10 月の間で 4 回、異なるサイズの個体の幹の周囲 1 m 内の根粒を全て採取した。採取は、幹の周囲から外側に向けて 20 cm 間隔でおこなった。根粒につながっている根の直径を、根粒の基部で測定し根粒のサイズとした。採取したそれぞれの根粒の乾燥重量を測定した。個体の周囲の根粒の水平分布は、同齡林内であるにもかかわらず、個体サイズ (1.3 m の高さの直径; dbh) により大きく異なった。特に、サイズの小さな個体では、根粒の数とバイオマスの変動が大きく、幹に近い部分に根粒の分布が集中していた。幹の周囲 1 m の範囲の単位面積あたりの根粒数と根粒バイオマスの分布の重心は、個体のサイズの増加に伴い幹から遠くなった。一方、個体サイズの増大に伴い、幹からの距離に対する根粒の分布の変動は減少した。また、根粒のサイズ構造も個体サイズ間で大きく変動した。幹の周囲 1 m の範囲内の根粒バイオマスは、個体サイズの増加と共に増加した ($[\text{根粒バイオマス}] = 0.442 [\text{dbh}]^{2.01}$, $R^2 = 0.747$, $P < 0.001$)。個体サイズと根粒バイオマスの相対成長関係式を用いて、根粒バイオマスは 84.1 kg ha^{-1} と推定された。以上の結果より、根粒バイオマスの推定には、特に天然更新した林分では、樹木個体のサイズと樹木の分布様式を考慮する必要があることが示唆された。

2. 2節

ハンノキ属樹種は、放線菌フランキアと共生し窒素固定を行うため、成長に伴い土壤中に窒素を蓄積し、他樹種が生育できる土壤環境を形成する。ハンノキ属樹種により大気中から固定された窒素は、樹体内に取り込まれ、その一部はリターフォールとリターの分解を通じて土壤に供給される。土壤攪乱地におけるハンノキ属樹種の窒素蓄積能を評価するために、天然更新したケヤマハンノキの林分において、窒素固定活性の季節変化とリターフォール量、葉リターの分解速度、土壤中の窒素蓄積量を測定した。窒素固定活性の季節変化は、4 月から 12 月までの成長期間を通じて、野外の温度条件下で、アセチレン還元法を用いて測定した。窒素固定活性に影響を及ぼす要因として、ケ

ヤマハンノキの成長様式（葉の展開、直径成長、リターフォール量）と地温を測定した。窒素固定活性は、葉の展開とともに上昇し、着葉量・地温ともに最大となる 8 月に最も高く、全て落葉した 12 月には活性がなかった。宿主の成長パターンとの関連が見られた。樹木個体サイズ間の窒素固定活性の変動は不明瞭であった。窒素固定活性は、主に、微生物の活動を制御する地温と、窒素固定のエネルギー供給源となるケヤマハンノキの着葉面積、さらに根粒のサイズにより推定することができた。窒素固定活性の季節変化と 2. 1 節で推定した根粒バイオマスの結果から年間の窒素固定量を推定した。換算比 3 を用いた場合、窒素固定量は $56.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ と推定された（換算比 4 の場合 $42.3 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ）。この値は、年間の葉リター中の窒素量の 66.4%（換算比 4 の場合 49.8%）に相当した。ケヤマハンノキがこの林分において窒素要求量の大きな部分を窒素固定に依存していることが明らかになった。リターフォール量は $3.8 \text{ ton ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ （1995 年 4 月から 12 月）で、ケヤマハンノキの葉が 81.4% を占めた。リターバック法によるケヤマハンノキの葉リターの分解実験の結果、重量は 1 年間で初期の約 70% 減少した（分解係数： $k = 1.13 \text{ yr}^{-1}$ ）。葉リター中の窒素含量は 1 年間で初期の約 58% 減少し、分解により土壤に供給される窒素量は $45.8 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ と推定された。土壤深 100 cm までの窒素蓄積量は 3.4 ton ha^{-1} で、表層の 0-5 cm に全体の約 30% が集積していた。落葉時の低い窒素再吸収効率（22.2%）、葉リターの速い分解を通じて、ケヤマハンノキにより固定された窒素の一部は、速やかに土壤に供給されており、まだ表層に限られるものの、約 18 年間に、生物窒素固定が土壤の肥沃化に貢献していることが明らかになった。

2. 3 節

窒素固定樹種であるケヤマハンノキの分布が、更新樹種の空間分布に及ぼす影響を評価するために、天然更新した約 18 年生のケヤマハンノキ林分の林床に更新した木本樹種の分布を調べた。調査区内に出現した更新樹種は、高木種 14 種、低木種 9 種の計 23 種、389 個体で、ほとんどの個体が樹高 3 m 以下であった。更新樹種の内 13 種が鳥散布型の種子を持つ樹種であった。更新個体はケヤマハンノキの近くに分布する傾向を示した。特に、比較的高い耐陰性を持つ鳥散布型の種子を持つ樹種が、ケヤマハンノキと同所的に分布した。これらの結果から、ケヤマハンノキは土壤攪乱を受けた立地において、更新する樹種にとって止まり木として利用され、母樹としての役割を果たしていることが示唆された。鳥散布型の種子を持つ樹種は、攪乱後にハンノキ属樹種により植生が回復した立地で、他の樹種よりも早く更新する可能性が示唆された。

第3章

3. 1節

ハンノキ属樹種の窒素固定に必要なエネルギー（光合成生産物の供給）は、土壤中の無機態窒素を吸収する際に必要なエネルギーよりも大きい。そのため、土壤中に無機態窒素が多く存在する場合、根粒形成の抑制や窒素固定活性の低下が生じる。同様の反応が大気中の二酸化炭素濃度が高い条件（高 CO_2 ）で生育するケヤマハンノキで生じるのか明らかにすることを目的とした。ケヤマハンノキの根粒形成と窒素固定量に及ぼす高 CO_2 と窒素供給量の影響を調べた。 CO_2 濃度を $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$ （通常 CO_2 ）と通常の2倍の $720 \mu\text{mol mol}^{-1}$ （高 CO_2 ）に設定した。養分処理では窒素を充分与える処理（High-N: $52.5 \text{ mgN pot}^{-1} \text{ week}^{-1}$ ）に対して、High-N の10分の1の窒素を与える処理（Low-N: $5.25 \text{ mgN pot}^{-1} \text{ week}^{-1}$ ）と窒素を与えない処理（N-free）を設定した。

ケヤマハンノキの1個体あたりの根粒バイオマスと樹木個体バイオマスは、通常大気に比べて高 CO_2 で生育させた場合に増加した。樹木個体バイオマスと根粒バイオマス間の相対成長関係は CO_2 処理による変化を示さなかったことから、成長促進による樹木個体バイオマスの増加に伴い根粒バイオマスが増加したことが明らかになった。 CO_2 処理に関わらず、High-N で他の2処理（Low-N と N-free）に比べて根粒バイオマスと樹木個体バイオマスに対する根粒バイオマスの比率が低下したことから、高 CO_2 下でも通常大気の場合と同様に、土壤の窒素供給量が多い時に根粒形成が抑制されることが明らかになった。N-free 区では樹体内に吸収した窒素源が窒素固定由来の窒素のみと考えられるため、1個体あたりの窒素固定量と根粒 1 g あたりの窒素固定活性を推定した。その結果、根粒の活性の上昇ではなく、高 CO_2 下での成長促進に伴う根粒バイオマスの増加により、高 CO_2 で樹木個体あたりの窒素固定量が増加することが示唆された。

3. 2節

ケヤマハンノキは順次開葉型の開葉様式を持つことに加え、根系に形成された根粒が光合成生産物のシンクとして機能するため、窒素固定能を持たない樹種に比べてシンク能が高い樹種と考えられる。そのため、窒素固定樹種のケヤマハンノキは、高 CO_2 下での光合成のダウンレギュレーションを回避し、高 CO_2 に対して理論的な予想に近い光合成応答を示すかもしれない。そこで、ケヤマハンノキの高 CO_2 に対する光合成反応の特徴を明らかにするために、窒素固定能を持たない樹種で、遷移系列上の位置と開葉様式が異なるミズナラとイタヤカエデを材料に用い、高 CO_2 に対する光合成反応を調べた。材料に3樹種のポット苗を用いた。自然光型ファイトトロンで、 CO_2 濃度を通常

と高 CO₂ (360 と 720 μmol mol⁻¹)、窒素供給量を High-N と Low-N (52.5 と 5.25 mgN pot⁻¹ week⁻¹) に設定して育苗した。処理開始後に開いた葉の光合成速度を携帯型光合成蒸散測定装置 (LI-6400、Li-cor) で測定した。葉齢約 2 週間の若齢葉と葉齢約 1 ヶ月の成熟葉を測定した。ミズナラは三次伸長期における葉齢約 1.5 ヶ月の成熟葉 (高齢葉) の測定も行った。100 日間の処理後、各処理 6 個体を採取し成長量を算出した。高 CO₂ 下での光合成活性の低下の大きさは葉の成熟段階により、また、遷移系列の異なる樹種により異なった。ケヤマハンノキでは、葉齢 2 週間の葉で高 CO₂ 下での光合成能力の低下が確認されたが、葉齢の上昇に伴う顕著な光合成のダウンレギュレーションは生じなかった。高 CO₂ 下での J_{\max} の低下が V_{\max} の低下に比べて小さく、 J_{\max} / V_{\max} 比が上昇したことから、理論的な最適窒素配分に近い反応を示すことが示唆された。ケヤマハンノキの反応は高 CO₂ に対する“順化”反応と呼べるかもしれない。一方、イタヤカエデの成熟葉 (葉齢 1 ヶ月) とミズナラの高齢葉 (葉齢 1.5 ヶ月) では、高 CO₂ 下での顕著な光合成のダウンレギュレーションが生じた。ケヤマハンノキと異なり、これら 2 種は、高 CO₂ 下で V_{\max} と J_{\max} ともに低下し、 J_{\max} / V_{\max} 比が変化しなかったため、葉内の光合成系内での窒素配分の変化が生じなかったことが示唆された。ケヤマハンノキの高 CO₂ 下での光合成能力の低下が他の 2 樹種に比べて顕著でなかったことは、順次開葉型の開葉様式を持つことに加えて、根粒形成や根粒による窒素固定のためのエネルギー源として光合成産物を利用することにより成長期間を通じてシンク能を高く維持することができることが影響していると考えられた。高 CO₂ 下での葉内の糖類の蓄積が不明瞭であったことからケヤマハンノキのシンク能の大きさが示唆された。個体重量の相対成長率は、ケヤマハンノキとミズナラ (High-N のみ) で高 CO₂ の正の効果があり、高 CO₂ に対する光合成反応の違いが成長反応にも反映されることが示唆された。

3. 3 節

ケヤマハンノキと、窒素固定能を持たないミズナラとイタヤカエデの間で、落葉の窒素含量と落葉前の窒素再吸収効率に及ぼす高 CO₂ と土壤の窒素供給量の影響の違いを明らかにすることを目的とした。材料には 3. 2 節と同じものを用いた。9 月から 11 月にかけて生育温度を段階的に下げ、落葉を毎日回収し、単位面積あたりの葉重量 (LMA) と重量あたりの窒素含量 (N_{mass}) を測定した。100 日後に刈り取った個体の生葉の窒素含量と比較して落葉時の窒素再吸収効率 (RE) を葉重量あたりと葉面積あたりの両方で算出した。ケヤマハンノキの落葉の N_{mass} は高 CO₂ 下で低下傾向を示したのに対し、ミズナラとイタヤカエデでは、逆に高 CO₂ 下で落葉の N_{mass} が増加する傾向を示した。

ケヤマハンノキでは、高 CO₂ 下で落葉の C / N 比が上昇したが (8% から 14%)、高 CO₂ 下での C / N 比の値が土壤の窒素供給量の違いに関わらず約 33 と比較的良かったため、高 CO₂ による葉リターの分解速度への影響は少ない可能性が推察された。落葉時の窒素再吸収効率は、ケヤマハンノキの High-N を除いて高 CO₂ で低下する傾向を示した。ケヤマハンノキ以外の 2 種では高 CO₂ 下での生葉の LMA の増加から、葉内窒素の中で構造的な窒素の割合がケヤマハンノキに比べて増加した可能性が示唆された。葉内の窒素配分の樹種間差が、成熟葉の高 CO₂ に対する光合成反応だけでなく、高 CO₂ 下での窒素再吸収効率の変化にも影響を及ぼした可能性が推察された。落葉の N_{area} は高 CO₂ で低下しなかった。ケヤマハンノキの High-N と Low-N とミズナラの High-N では、高 CO₂ で成長量が促進され、樹木個体あたりの葉面積が増加したため、落葉による土壤への窒素供給量が高 CO₂ で増加することが明らかになった。特に、ケヤマハンノキでは、他の 2 樹種と異なり窒素不足の立地でも高 CO₂ 下で成長量が増加し、落葉による土壤への窒素供給が増えたことから、窒素以外の養分や水分が制限されていない場合、落葉の分解速度の変化に依存しているが、高 CO₂ 下で窒素固定の増加による窒素不足の土壤への窒素供給量の増加が期待できると考えられた。

第 4 章

生物窒素固定には多量のリンが利用されるため、窒素固定樹種は他の窒素固定能を持たない樹種に比べてリン酸の要求度が高い。また、土壤水分条件と土壤養分条件の複合効果に対する樹木の反応に対する知見は不足している。そこで、ケヤマハンノキの根粒形成と光合成反応、成長に及ぼす高 CO₂、土壤リン酸供給量、土壤乾燥の相互効果を明らかにすることを目的として実験を行った。同属のミヤマハンノキも対象とした。ポット植栽苗を、自然光のファイトトロンを用いて、通常 CO₂ (360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, 36 Pa CO₂) と高 CO₂ (720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, 72 Pa CO₂) 下で生育させ、その中で、2 段階のリン酸供給量 (7.74 mgP pot⁻¹ week⁻¹ (High-P) と 0.774 mgP pot⁻¹ week⁻¹ (Low-P)) と 2 段階の灌水頻度の処理 (週 3 回と週 1 回) を施した。アセチレン還元法により根粒のニトロゲナーゼ活性を調べた。ケヤマハンノキとミヤマハンノキの両樹種で、High-P に限って、土壤水分条件に関わらず高 CO₂ で窒素固定能力が上昇することが示唆された。その原因は、根粒のニトロゲナーゼ活性の上昇ではなく、主に樹木個体の重量の増加に伴う個体あたりの根粒バイオマスの増加によることが示唆された。一方、リン酸供給量不足では樹木個体の成長量が顕著に抑制され、根粒バイオマスの増加が生じず、高 CO₂ による窒素固定量の促進効果が現れないことが示唆された。高 CO₂ 下でもハンノキ属樹種の樹木個体あたりの窒素固定量の増加のためには、リン酸供給が必要であることが示唆された。