

## 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量の評価

飛田博順 (森林総研)

要旨：ハンノキ属は放線菌フランキアと共生し窒素固定を行うため、成長に伴い土壌中に窒素を蓄積し、他樹種が生育しやすい土壌環境を形成する。土壌攪乱地におけるハンノキ属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、土壌中の窒素蓄積量の把握を行った。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月に最も高くなった。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、ケヤマハンノキの着葉面積、根粒のサイズ、土壌温度により推定することができた。林分あたりの年間窒素固定量は、年間の葉リター中の窒素量の66.4%に相当する、 $56.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ と推定された。林分内の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。

キーワード：アクチノリザル植物、フランキア、ハンノキ属、窒素固定、アセチレン還元法

**Abstract** : To estimate the  $\text{N}_2$  fixation ability of *Alnus hirsuta* (Turcz.), I examined the seasonal variation of  $\text{N}_2$  fixation of nodules by acetylene reduction (AR) method in an 18 year old stand naturally regenerated after disturbance by road construction in Japan. To evaluate the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to N economy in this *Alnus* stand, I also measured the amount of litterfall, decomposition rate of leaf litter, and N accumulation within soil. Acetylene reduction activity per unit mass of root nodules (ARA) under field condition appeared after budbreak, reached maximum activity in midsummer after full expansion of the leaves, and disappeared after falling of all leaves. There was no consistent correlation between ARA and tree size (dbh). ARA was calculated by using a generalized linear model, which contains leaf area, nodule size, and soil temperature as explanatory factors. The amount of  $\text{N}_2$  fixed in this *A. hirsuta* was estimated  $56.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  when a theoretical molar ratio of 3 was used to convert the amount of reduced acetylene to the amount of fixed nitrogen. This amount of  $\text{N}_2$  fixation corresponded to the 66.4 % of N within leaf litter produced within a year. These results suggested that  $\text{N}_2$  fixation still contributed to the large portion of N economy in this *A. hirsuta* stand.

**Keywords** : actinorhizal plants, *Frankia*, litterfall, nodule

### I はじめに

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。温帯から冷温帯の森林生態系の窒素循環においては、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 (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(6,10)。ハンノキ属樹木の起源の中心は、種数の多さと固有種の多さから北東アジアと考えられている(8)。しかし、林分規模での窒素固定量の把握に関してはデータが不足している状況である。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が、日本ではハンノキ属樹種の人工林は少なく、天然更新林分が大部分を占めるため、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、近年問題になっている大気中の二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ ) 濃度の上昇の問題に対しても、ハンノキ属樹種のような窒素固定能力を持つ樹種は、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期待されている(4)。気候変化が生じる前のハンノキ属樹種の林分レベルでの窒素固定量の把握が必要であると考えられる。

そこで、本研究では、ハンノキ属ケヤマハンノキの天然更新林分において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。これまでに、この対象林分において樹木個体サイズの変化に伴い根粒サイズ分布や個体あたりの根粒重量が変化することを明らかにした(15)。本研究では、ケヤマハンノキの根粒の窒素固定活性の季節変化から単位根粒量あたりの窒素固定量を推定し、根粒重量のデータ(15)を元に林分あたり窒素固定量を評価した。また、林分内の窒素移動量・蓄積量を明らかにし、林分内の窒素固定量の位置付けを試みた。

Hiroyuki TOBITA (Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), Tsukuba 305-8687).  $\text{N}_2$  fixation in a naturally regenerated stand of *Alnus hirsuta* (Turcz.) at degraded area by road construction.

## II 調査地と方法

1. 調査地 調査地は岐阜県高山市、標高約 1100 m の林道脇のケヤマハンノキ林分に 30 m × 35 m の調査枠を設定した (36°9'N, 137°15'E)。1975 年の道路建設の際の攪乱跡地に天然更新した林分と考えられる。平均樹高は約 15 m で、林冠はほぼ閉鎖していた(2,15)。立木密度は 1114 本 ha<sup>-1</sup>、平均胸高直径 (dbh) は 12.4 cm、胸高断面積合計は 14.8 m<sup>2</sup> ha<sup>-1</sup> であった。枯死個体も数個体存在した。調査地の深さ 10 cm の土壌温度を 30 分間隔で測定した (Grant SQ8-4U, Cambridge)。

2. 成長様式 林縁のケヤマハンノキ 2 個体について当年枝 93 本の枝長、葉数と葉の長さ、幅、落葉数を測定した。ケヤマハンノキ全個体の dbh を毎月測定した。リタートラップにより毎月リターフォールを回収した (n = 10)。リターを 80°C で乾燥させ、ケヤマハンノキの各器官別に重量を測定した。当年枝レベルの落葉パターンの結果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 (相対着葉面積 (cr-LA) と呼ぶ) の季節変化を推定した。葉重量と葉面積の季節変化が同じと仮定した。

3. 根粒の窒素固定活性の季節変化 根粒の窒素固定活性の測定をアセチレン還元法(1)により成長期間を通じて行った。測定値をアセチレン還元活性 (ARA) と呼ぶ。調査地内で dbh が 6 cm から 21 cm の範囲の個体を選んだ (1 から 5 個体)。1 個体あたり 6 から 18 個の根粒を採取し ARA を測定した。2 年間測定した。培養は野外条件下で行った (12 時 30 分から 13 時 30 分の間)。2 cm 以上の根系を付けた根粒を、土壌中に埋めた 200 ml のガラス製容器に密閉し、気相の約 10% をアセチレンで置換し培養した。30 分後、容器内のガスサンプルを 3 ml の真空採血管で採取し、エチレン量を FID ガスクロマトグラフで分析した (263-30, HITACHI, Tokyo)。1 m ガラスカラムを用い (100/120-mesh Porapak R)、検出器を 75 度、カラムを 60 度に設定した。アセチレンガス中のエチレン混入量、根粒からのエチレン発生はいずれも検出されなかった。

ARA と窒素固定活性の換算比は、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、4 対 1 付近まで変化する(14)。本研究では 3 対 1 の換算比を用い、一部、参照として 4 対 1 の結果を併記した。

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 (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)。解析に用いた説明変数は、測定年、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)、根粒採取地の幹からの距離、土

壌温度である。

各個体の根粒サイズ割合はワイブル分布のパラメータと dbh の関係式を用いて推定した(15)。根粒サイズ (mm) と根粒重量 (g) の関係は目視で腐朽が確認されなかった根粒を用いて求めた。

[根粒重量] = 0.0413 × [根粒サイズ]<sup>1.850</sup>; n = 399, R<sup>2</sup> = 0.648  
根粒に腐朽がないと仮定し、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。個体の根粒重量が 1 g の場合の根粒サイズ頻度と各サイズ階の平均根粒重量の積を根粒重量比とした。選定されたモデルを用いて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した。根粒重量比をかけた後、全根粒サイズの値を合計し、各個体の根粒 1 g あたりのアセチレン還元量を算出し、窒素固定量に換算した。各個体の根粒重量を dbh から推定し(15)、個体あたりの窒素固定量を算出した。

[根粒重量] = 0.442 × [dbh]<sup>2.01</sup>; n = 12, R<sup>2</sup> = 0.770

5. 落葉の分解 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。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。5 月から 12 月まで毎月回収し (n = 10) 乾燥重量を測定した。葉リターの分解係数 (k) を算出した(9)。

6. 林床有機物と鉱物質土壌 5 月から 11 月まで毎月 50 × 50 cm 枠 3 カ所の林床植生と A<sub>0</sub> 層を採集した。8 月に土壌断面を掘り、土壌層中の炭素と窒素の垂直分布を測定した。表層から 30 cm 深まで 5 cm 間隔と、40 cm、60 cm、85 cm 深で土壌を採取した。

7. 化学分析 リターフォール、リターバック法のサンプル、林床植生、A<sub>0</sub> 層の有機物、土壌サンプルの窒素・炭素濃度を分析した (MT-600; Yanaco, Kyoto)。

## III 結果と考察

1. 成長様式 5 月上旬に開葉が始まり、土壌温度が最も高くなる 8 月上旬に新たな葉の生産は終了し、着葉面積が最大に達した (図-1)。6 月から観察された落葉は 10 月上旬に急増した。11 月上旬には樹冠上部に少量の葉が残っていた。冬期を除く全リターフォール量は 3.77 ton ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> であり、その中でケヤマハンノキの葉リターは 3.07 ton ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> で全リター量の 81.4% を占めた。

2. 根粒の窒素固定活性の季節変化 4 月下旬には土壌温度は約 8 度で、開葉はまだ始まっておらず、アセチレン還元活性 (ARA) は検出されなかった (図-2)。ARA は開葉後の 5 月上旬から検出され、着葉面積と土壌温度が最大になる 8 月上旬に最大に達した。11 月上旬には雪に覆われ土壌温度が約 5 度であったが ARA が検出さ

れた。落葉終了後の12月上旬にはARAが検出されなかった。dbhとARAの間には一貫した傾向が見られず、被圧木が必ずしもARAが低い訳ではなかった。

3. 窒素固定量の推定 一般化線形モデル解析により測定年、dbh、幹からの距離はARAの説明変数から除外された。モデル選択では相対着葉面積(*cr-LA*)と根粒サイズが説明変数として選択された(AIC = 3082, 残渣の逸脱度 = 467.7)。上記2要因に土壤温度を説明変数に加えた場合にAICの変化が小さかった(AIC = 3082.8, 残渣の逸脱度 = 466.72)ため、本研究ではARAの説明変数として土壤温度を加えたモデル1を用いた。

$$[ARA] = \exp(1.12 + 0.033 \times [cr-LA] - 0.247 \times [根粒サイズ] + 0.036 \times [土壤温度]) \dots (\text{モデル1})$$

ARAは相対着葉面積の増加と土壤温度の上昇に伴い上昇した。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。

以下、1年目の推定結果を示した。根粒1gあたりの1年間のアセチレン還元量は0.071 (0.069-0.072) mol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> nodule yr<sup>-1</sup>であり、根粒1gあたりの年間窒素固定量は0.66 (0.64-0.67) gN g<sup>-1</sup> nodule yr<sup>-1</sup>と換算された。換算比4では、0.50 (0.48-0.50) gN g<sup>-1</sup> nodule yr<sup>-1</sup>であった。調査地の個体あたりの根粒重量の平均値は77.5 g tree<sup>-1</sup> (5.6 から 199.2 g tree<sup>-1</sup>)と推定され(15)、個体あたりの年間平均窒素固定量は50.6 gN tree<sup>-1</sup> (3.7から126.6 gN tree<sup>-1</sup>)と算出された。調査林分内の単位面積あたりの窒素固定量は56.4 kgN ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> (換算比4の場合42.3 kgN ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>)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kgN ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>から320 kgN ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>という広範囲の値に含まれる結果であった(3,5,7,11,14)。

比較のため、他のモデルによる計算結果(換算比3)を示す。相対着葉面積と根粒サイズによるモデルでは、林分の窒素固定量は55.6 kgN ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>と推定され、モデル1の結果と差がなかった。一方、土壤温度のみのモデルでは68.0 kgN ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>と推定され、モデル1より約20%多く推定された。

4. 林分内の窒素移動量と蓄積量 リターフォール中の窒素含量の合計は94.9 (± 3.56) kg ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>であった。葉リター中に含まれる窒素含量は84.9 (± 2.11) kg ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>で、全リターフォール中の89.4%を占めた。リターバック内のケヤマハンノキの葉リターは1年間で初期重量の70%が減少し、分解係数*k*は1.13 yr<sup>-1</sup>であった。葉リター中の窒素含量は、1年間で初期の58.4%が減少し45.8 kg ha<sup>-1</sup>の窒素が放出された。8月の草本バイオマスとA<sub>0</sub>層の窒素含量は57.9と146.2 kg ha<sup>-1</sup>であった。鉦

物質土壌層中の炭素と窒素濃度は、表層の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%)。土壌層0-100 cmまでの炭素と窒素の蓄積量は、32.0 ton ha<sup>-1</sup>と3.4 ton ha<sup>-1</sup>であり、窒素では約30%が表層土壌(0-5 cm深)に分布した。攪乱直後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、攪乱後21年間に土壌層(0-100 cm)中に蓄積された窒素量は1.4 ton ha<sup>-1</sup>と推定され、攪乱後の平均窒素蓄積量は66.7 kg ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>と推定された。

5. 林分内の窒素循環に対する窒素固定の寄与 今回のケヤマハンノキ林分あ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%, 換算比4の場合49.8%に相当した(図-3)。また、葉リターの分解により1年間に土壌に放出される窒素量に対して123.2%に相当し、8月の林床の草本層に蓄積される窒素量に対して104.0%に相当した。また、土壌中の推定年平均窒素蓄積量に対して90.3% (換算比4の場合67.7%)に相当した。

*Alnus nepalensis*の人工林では、林齢が7年生から56年生へ高くなると、年間窒素固定量が117.29 kg ha<sup>-1</sup>から29.05 kg ha<sup>-1</sup>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%に低下した(13)。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の窒素量(98.4 kgN ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>: 冬期を含む)に対して、窒素固定量は61.2%に相当した。*Alnus nepalensis*の人工林では、17年から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壌へ供給される窒素の割合が54%から59%の範囲であった(12,13)。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を用いると、窒素吸収量は166.8から188.2 kgN ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>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29.3%から33.1% (換算比4の場合; 22.0%から24.8%)と推定できた。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。

#### IV おわりに

本研究では、樹木個体ごとの根粒サイズ頻度分布の違いを考慮して、ケヤマハンノキ天然更新林分における窒素固定量を評価することができた。ただし、推定には多くの仮定をおいている点を認識する必要があると考える。

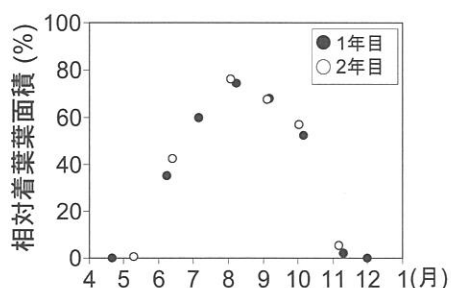


図-1. ケヤマハンノキの相対着葉面積の季節変化

Fig.1 Seasonal change in leaf area of *Alnus hirsuta*

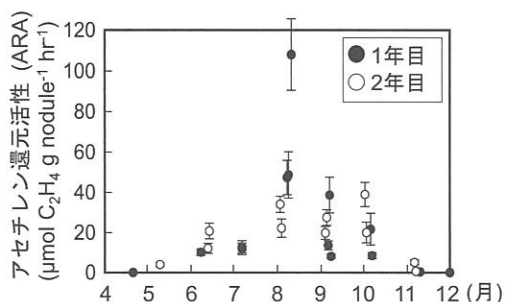


図-2. 根粒の窒素固定活性の季節変化

Fig.2 Seasonal variation in acetylene reduction activity

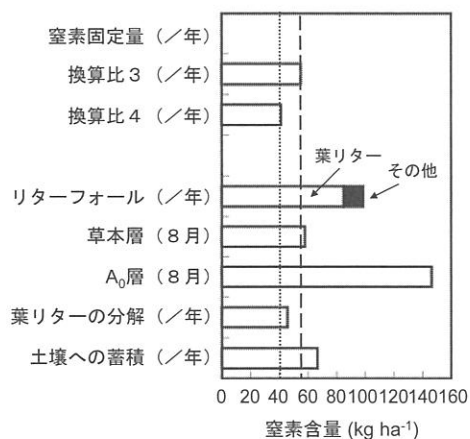


図-3. 林分内の窒素移動量と蓄積量

Fig.3 Nitrogen cycle in this *Alnus* stand

## V 参考文献

(1) 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

(2) 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** : 38-48

(3) 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

(4) HUNGATE BA, DUKES JT, SHAW MR, LUO Y, FIELD CB (2003) Nitrogen and climate change. *Science* **302** : 1512-1513

(5) HURD TM, RAYNAL DJ, SCHWINTZER CR (2001) Symbiotic N<sub>2</sub> fixation of *Alnus incana* ssp. *rugosa* in shrub wetlands of the Adirondack Mountains, New York, USA. *Oecologia* **126** : 94-103

(6) HUSS-DANEL K (1997) Actinorhizal symbioses and their N<sub>2</sub> fixation. *New Phytol.* **136** : 375-405

(7) LEE YY, SON Y (2005) Diurnal and seasonal patterns of nitrogen fixation in an *Alnus hirsuta* plantation of central Korea. *J. Plant Biol.* **48** : 332-337

(8) NAVARRO E, BOUSQUET J, MOIROUD A, MUNIVE A, PIOUS D, NORMAND P (2003) Molecular phylogeny of *Alnus* (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant Soil* **254** : 207-217

(9) OLSON JS (1963) Energy storage and the balance of producers and decomposition in ecological systems. *Ecology* **44** : 322-331

(10) PAWLOWSKI N, NEWTON WE (2008) Nitrogen - fixing Actinorhizal Symbioses. Springer, Dordrecht, Netherlands. 310 pp.

(11) SANBOEN P, PRESTON C, BROCKLEY R (2002) N<sub>2</sub>-fixation by Sitka alder in a young lodgepole pine stand in central interior British Columbia, Canada. *For. Ecol. Manage.* **167** : 223-231

(12) SHARMA E (1993) Nutrient dynamics in Himalayan alder plantation. *Ann. Bot.* **72** : 329-336

(13) SHARMA E, AMBASHT RS (1988) Nitrogen accretion and its energetics in the Himalayan alder. *Funct. Ecol.* **2** : 229-235

(14) 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

(15) TOBITA H, HASEGAWA FS, TIAN X, NANAMI S, TAKEDA H (2010) Spatial distribution and biomass of root nodules in a naturally regenerated stand of *Alnus hirsuta* (Turcz.) var. *sibirica*. *Symbiosis* **50** : 77-86