

東南アジア熱帯林における高解像度3次元モニタリングによる 生物多様性・機能的多様性の評価手法の開発

Development of methodology for species and functional diversity assessment
in Southeast Asian tropical forests
using by high-resolution 3D monitoring technique

平成28～30年度
FY2016～2018

NIES



国立研究開発法人 国立環境研究所
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES
<http://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第135号

NIES Research Project Report, No.135

SR-135-2019

東南アジア熱帯林における高解像度3次元モニタリングによる 生物多様性・機能的多様性の評価手法の開発

Development of methodology for species and functional diversity assessment
in Southeast Asian tropical forests
using by high-resolution 3D monitoring technique

平成28～30年度
FY2016～2018

序

本報告書は、平成 28～30 年度の 3 年間で実施した、所内公募型研究提案 (A) 「東南アジア熱帯林における高解像度 3 次元モニタリングによる生物多様性・機能的多様性の評価手法の開発」(課題代表者：大沼 学) の研究成果をまとめたものです。

熱帯林は、世界的にも貴重な生物多様性の宝庫であり、炭素源としての役割も大きく担う森林です。これまで国立環境研究所では、マレーシアのパソ森林保護区を拠点とし、熱帯林生態系やそれを取り巻く環境の研究を進めてきました。これまでの研究からは、熱帯原生林では、地上部だけでなく林冠部も生物活動が盛んであること、森林内の環境は不均一性が高く、種・機能の多様性の維持に役立っていること、熱帯林は多様な生物起源揮発性有機化合物 (BVOC) を大量に生産・放出しており、生物間および生物-大気間の相互作用が活発であることなどがわかってきました。一方、熱帯では干ばつや洪水などの極端な気象現象が顕在化しており、これらの気候変化が、熱帯林の生態系プロセスや環境を変化させ、ひいては森林構造や生物多様性そのものに影響を与えると考えられます。その影響を検出するためには大気・生物の相互作用のプロセスを統合的に解析する必要があります。

本研究では、垂直方向にも水平方向にも環境・生物の分布が不均一である熱帯林で高解像度 3 次元の生態系の観測方法を開発することを目的としました。研究の基盤となる地上における動植物のモニタリングを効率化するだけでなく、近年技術の発展が著しいドローンでの空撮や、環境中の水に含まれる DNA から種判別を行う環境 DNA 技術を取り入れた手法を検討しました。本研究で得られたデータからは、森林内の光環境に応じて植物の光合成活性や BVOC の放出量が異なること、熱帯林の種多様性が林冠構造と関係があること、絶滅危惧種を多く含む豊かな動物の多様性があることが明らかになりました。今後、本報告書の中の知見や技術を応用することにより、大面積での調査や、生態系プロセスのメカニズムを統合的に理解する研究に発展することが期待されます。

また、本研究を進めるにあたり、所内外の多くの方々にご協力頂きましたことに心から御礼申しあげます。

2019 年 12 月

国立研究開発法人 国立環境研究所

理事長 渡 辺 知 保

目 次

1. 研究の概要	1
1.1 研究全体の目的、目標、構成等	1
1.2 研究の概要	2
1.2.1 サブテーマ1：生物起源揮発性有機化合物を含む植物生理機能の多様性評価手法の開発 (担当：斉藤、富松)	2
1.2.2 サブテーマ2：低高度リモセン技術を用いた林冠3D構造の復元手法と生物多様性指標の開発 (担当：竹内、三枝)	2
1.2.3 サブテーマ3：メタバーコーディング技術を応用した陸上動物の多様性評価手法の開発 (担当：大沼)	2
2. 研究の成果	3
2.1 サブテーマ1 生物起源揮発性有機化合物を含む植物生理機能の多様性評価手法の開発	3
2.1.1 目的と経緯	3
2.1.2 方法	3
2.1.2.1 林床の微環境と植物のモニタリング	3
2.1.2.2 微環境変動に応答する植物機能特性の観測	5
2.1.3 結果と考察	6
2.1.3.1 林床の微環境と植生の追跡調査	6
2.1.3.1.1 林床の微環境	6
2.1.3.1.2 実生と稚樹の追跡調査	8
2.1.3.2 耐陰性が異なる樹種における光合成誘導反応の特徴	8
2.1.3.2.1 光照射に対する光合成応答と耐陰性の関係	8
2.1.3.2.2 稚樹の生育環境の明るさと光合成誘導反応速度の関係	9
2.1.3.2.3 サンフレックに起因する葉温の上昇と光合成誘導反応の関係	11
2.1.3.3 イソプレンの放出と光環境の関係	12
2.1.4 サブテーマ1のまとめ	14
2.2 サブテーマ2 低高度リモセン技術を用いた林冠3D構造の復元手法と生物多様性指標の開発	16
2.2.1 目的と経緯	16
2.2.2 方法	16
2.2.2.1 調査地	16
2.2.2.2 地上調査：地形・GCPの設置	17
2.2.2.2.1 地形調査	17
2.2.2.2.2 基準点（Ground Control Point、GCP）の設置	17
2.2.2.3 UAVによる森林空撮の最適条件の検索	18
2.2.2.3.1 UAV仕様および飛行コース	18
2.2.2.3.2 UAVの発着プラットフォーム	19
2.2.2.3.3 UAVの飛行条件	19
2.2.2.4 空撮画像の処理と林冠3Dモデル化	19
2.2.2.5 ArcGIS 10.6による解析	20
2.2.2.5.1 DEMの作成	20

2.2.2.5.2	精度検証	21
2.2.2.5.3	林冠構造の複雑を表す指標	21
2.2.2.6	データ解析	21
2.2.2.6.1	種多様性指標	21
2.2.2.6.2	統計解析	21
2.2.3	結果と考察	22
2.2.3.1	SfMによるDSM、オルソモザイク画像	22
2.2.3.2	林冠3Dモデル化の精度	22
2.2.3.3	林冠高の3年間の変化	22
2.2.3.4	種多様性指標と林冠構造指標の相関	23
2.2.4	サブテーマ2のまとめ	26
2.3	サブテーマ3メタバーコーディング技術を応用した陸上動物の多様性評価手法の開発	29
2.3.1	目的と経緯	29
2.3.2	方法	29
2.3.2.1	野外用カメラを利用した野生動物分布調査	29
2.3.2.2	飼育施設を利用した予備実験（雨水による動物種の判別）	29
2.3.2.3	パソ森林保護区における環境DNAを活用した動物種の判別	31
2.3.3	結果と考察	32
2.3.3.1	パソ森林保護区に分布する野生動物種の把握	32
2.3.3.2	飼育施設を利用した予備実験	35
2.3.3.3	パソ森林保護区内で得られた環境DNAを活用した動物種の判別	37
2.3.4	サブテーマ3のまとめ	39

【資料】

1.	研究の組織と研究課題の構成	43
1.1	研究の組織	43
1.2	研究課題と担当者	43
2.	研究成果発表一覧	44
2.1	口頭発表	44

1. 研究の概要

1.1 研究全体の目的、目標、構成等

本研究は、気候変化の熱帯林生態系へのフィードバック機構を解明するため、大気圏と相互作用をもつ森林生態系機能プロセス、森林・林冠構造の複雑性、野生動物の種多様性の3点について動態と変化を広域・長期的・高解像度でモニタリングする手法を開発することを目標とする。この目標を達成するために、本研究ではサブテーマを以下の三つ設ける。研究拠点は、マレーシア・パソ森林保護区とする（図1）。また、可能な範囲でボルネオ島でもパソで開発した技術の有効性の検証と応用研究を行い、東南アジア全域への展開の足掛かりとする。

サブテーマ1：生物起源揮発性有機化合物を含む植物生理機能の多様性評価手法の開発（担当：齊藤、富松）

サブテーマ2：低高度リモセン技術を用いた林冠3D構造の復元手法と生物多様性指標の開発（担当：竹内、三枝）

サブテーマ3：メタバーコーディング技術を応用した陸上動物の多様性評価手法の開発（担当：大沼）

最終的にはサブテーマ1から3をつなぐことで、東南アジアにおいて大面積で実施可能な高解像度3次元モニタリングによる熱帯林の生物多様性・生態系機能の統合的評価法を開発する（図2）。

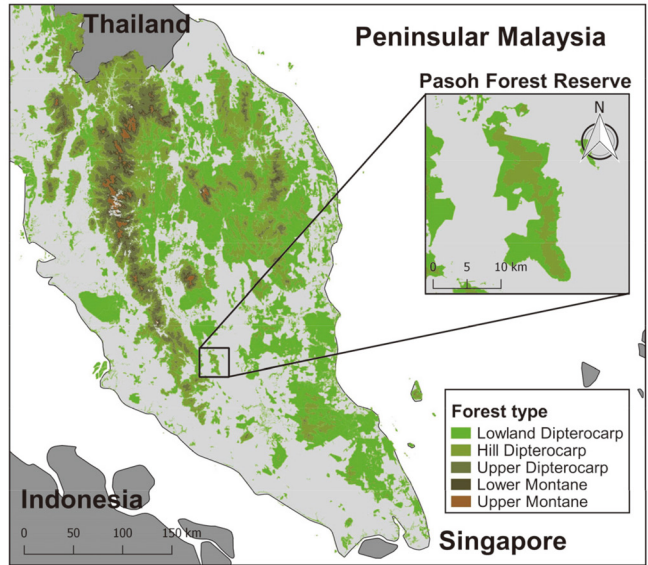
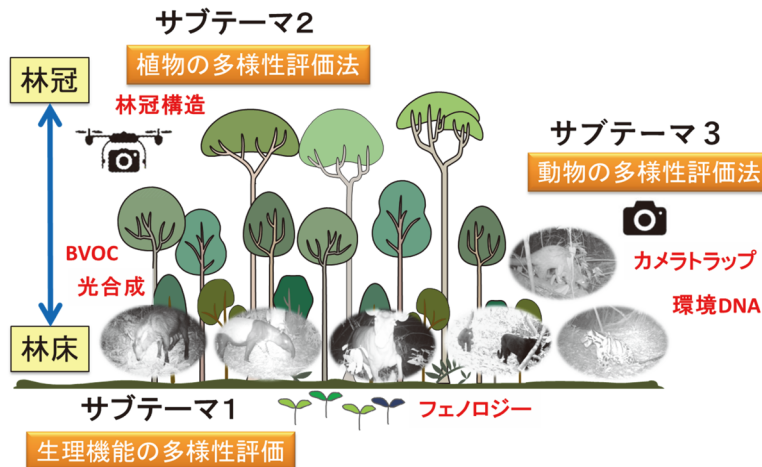


図1 本研究を実施したパソ森林保護区の位置

- サブテーマ1: 生物起源揮発性有機化合物を含む植物生理機能の多様性評価手法の開発 (担当: 齊藤、富松)
- サブテーマ2: 低高度リモセン技術を用いた林冠3D構造の復元手法と生物多様性指標の開発 (担当: 竹内、三枝)
- サブテーマ3: メタバーコーディング技術を応用した陸上動物の多様性評価手法の開発 (担当: 大沼)



東南アジアにおいて大面積で実施可能な高解像度3次元モニタリングによる熱帯林の生物多様性・生態系機能の統合的な評価法の開発

図2 本研究の概要

1.2 研究の概要

1.2.1 サブテーマ1：生物起源揮発性有機化合物を含む植物生理機能の多様性評価手法の開発（担当：斉藤、富松）

多様な微環境に応じた植物の機能特性から、熱帯林内の生物多様性を表す汎用性ある指標を開発することを目的とする。熱帯原生林内に複数の計測拠点を設け、植物の生理機能特性と微環境を計測する。対象とする植物生理機能としては、BVOC 放出、ガス交換能、窒素含有量、形態特性、フェノロジー等とし、これら植物生理機能間、および生理機能と微環境との関連性を解析する。これにより、微環境の不均一性がもたらす植物の機能的な多様性を明らかにすることを目的とする。これら植物生理機能特性に基づいた多様性評価手法によって、環境変化や気候変動に対する多様性変化や安定性などを植物生理機能に基づいて予測する事が可能となる。

1.2.2 サブテーマ2：低高度リモセン技術を用いた林冠3D構造の復元手法と生物多様性指標の開発（担当：竹内、三枝）

熱帯地域における生物多様性の広域評価に向け、生物多様性と林冠構造の関係性について明らかにすることを目的とする。まず、熱帯林の林冠構造を評価するため、マレーシア熱帯原生林を上空から無人航空機（UAV）で撮影し、複数の画像から対象物の3D形状を復元する Structure from Motion 技術に基づき林冠3D構造モデルを生成する手法を検討する。そこから林冠表面の複雑性を示す指標を複数作成し、林冠構造指標と種多様性指標に正の相関がみられるかについて統計解析により検証する。

1.2.3 サブテーマ3：メタバーコーディング技術を応用した陸上動物の多様性評価手法の開発（担当：大沼）

2015年に魚の糞などとともに水中に放出されたDNAを解析し、そこに生息する魚の種類を判定する技術が開発された。この技術を熱帯林内で採取した雨水や河川水に応用する。また、野外用カメラによる自動撮影も調査地で実施し、DNA検出による種判別の有効性を評価する。熱帯林内で採取したこれらの水には分布する動物の糞、尿、皮膚組織等が含まれていることが期待される。これによって、林内で雨水等をサンプルすることで時間的、空間的に生活様式を特殊化した熱帯林の哺乳類相を把握できるようになると期待される。

2. 研究の成果

2.1 サブテーマ1 生物起源揮発性有機化合物を含む植物生理機能の多様性評価手法の開発

2.1.1 目的と経緯

熱帯林の特徴の一つは、突出木、高木、亜高木、低木といった高さの異なる樹木が階層構造を形成している点にある。この複雑な林冠構造によって太陽光は容易に地表まで到達しないため、一般に熱帯林の林床は非常に暗く、種から発芽した実生や実生から成長した稚樹にとって重要な光資源（光合成有効光量子束密度：以下PPFD）が大きく制限されている¹⁾。一方で、限られた光資源とは対照的に、CO₂は下層植物にとっては十分にある。これは、閉鎖された林冠のため、土壌から排出されるCO₂（土壌呼吸）が林床付近で蓄積しやすくなるためである²⁾。

こうした特徴を持つ熱帯林の林床において、林冠の隙間から時折注ぐ強い光（木漏れ日、サンフレック）は林床植物にとって貴重な光資源になり、特に倒木などによって林冠の開けた林床（ギャップ）でみられる。しかし、複雑な林冠構造によりサンフレックは不規則に発生する上、その照射時間も短いため、植物がサンフレックを効率よく利用することは容易ではない。これまでの研究では、林床植物によるサンフレックの利用効率は種の耐陰性によって異なり、一般に耐陰性の高い種で利用効率が高いとされている。その理由として、暗い環境に耐えられる耐陰性の高い種は、耐陰性の低い種よりも生育環境における光資源が少ないため、よりサンフレックに依存した生理特性を持つに至った可能性がある。しかし、その生理学的な必然性については必ずしも明瞭ではない。また、サンフレックでは葉への光照射により葉温が上昇するため光合成速度も高くなるが、ある最適温度を超えると光合成速度は急激に低下する。しかし、光強度の変化に伴うこのような温度の効果が、急激に変動する光環境下でどのように光合成速度に影響するのかについては不明な点が多い。

葉温のコントロールには、ストレス応答として植物が放出する生物起源揮発性有機化合物（BVOC）が関係しているとの報告がある³⁾。遺伝子組み換え植物を使ったこの研究では、BVOCの一種であるイソプレンの生合成は葉温を低下させる効果を持ち、植物の高温耐性に寄与していると報告している。熱帯林では、光資源の限られた林床に生育する稚樹がサンフレックをより効率的に利用するため、葉温低下効果を持つイソペンなどのBVOCを利用している可能性も考えられる。一方、光資源に乏しい林床とは対照的に、熱帯林の林縁部や林外では光資源が植物にとって過剰に存在するため、高温耐性を高めるためにイソペンなどのBVOCを利用している可能性も考えられる。しかし、熱帯林におけるBVOCの役割を植物の生理機能特性の一つとして明らかにした例は限られており、不明な点が多い。

このように、時空間的に大きく変化する熱帯林の内外の環境（光、気温等）に対して、植物（稚樹）の生理機能が、どのように応答しているのか十分に明らかにされておらず、生理機能の中でも、ストレス応答として植物が放出するBVOCに関する理解が特に遅れている。そこで本サブテーマでは、熱帯林の林床における植物の機能的な多様性を明らかにすることを目的とした。本研究ではまず、植物周辺の微小空間における環境（微環境）の物理的な特徴とそこに生育する植物の動態（植物の種や個体数の変化）を把握するため、マレーシア半島部のパソ森林保護区において林床の微環境と植物のモニタリングを実施した。続いて、モニタリングから得られた基礎データ等から耐陰性の異なる種を選定して、光合成速度やBVOC放出特性などの植物生理機能の測定を行った。

2.1.2 方法

2.1.2.1 林床の微環境と植物のモニタリング

マレーシア半島部のパソ森林保護区の9カ所に観測プロットを設置し、気温、大気湿度、土壌水分、地温、光環境などの微環境を観測した（図3）。各プロットには1m×1mの5つのサブプロットを設け、その中に出現した全ての個体について個体数、フェノロジー、個体成長、種多様性に関する追跡調査を毎年8月上旬に実施した。また、9つ全ての観測プロットの中央で全天写真を毎年2回撮影（Nikon coolpix950、図4）し、林冠の開空度の経時的な変化を測定した。

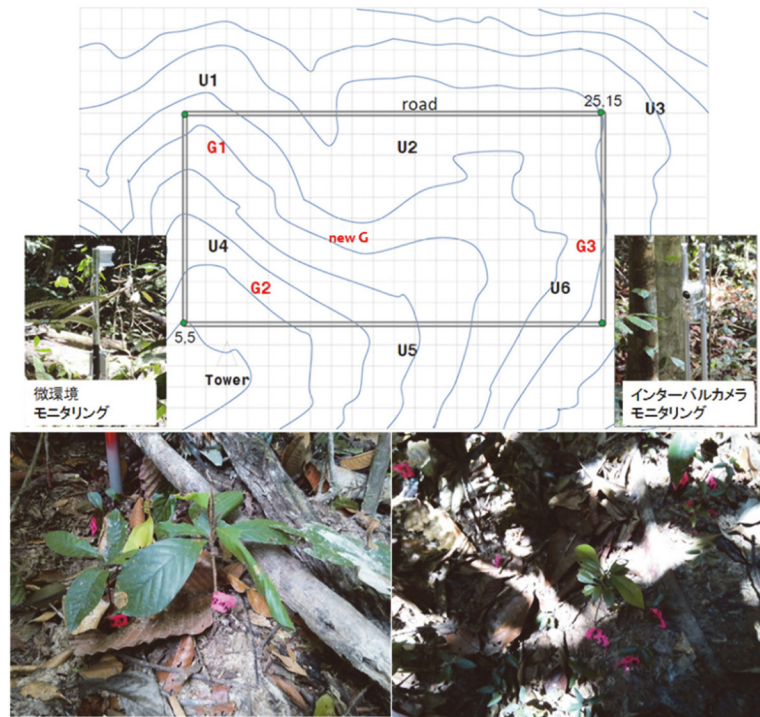


図3 パン森林保護区における林床の微環境と植物のモニタリング。(図上部の地図) パン森林保護区に設定した9カ所のプロット位置図。プロットは、2015年に倒木などによって林冠の開けた林床(ギャップ)に3カ所(G1~G3)、林冠の閉じた暗い林床に6カ所(U1~U6)に設置した。また、new Gは2017年に確認された新しいギャップを示す。各プロットでは、気温、大気湿度、土壌水分、地温などの微環境モニタリングと自動撮影カメラによる実生フェノロジーのモニタリングを行った。(図下部の写真)プロット内に設定したサブプロットにおける植生の追跡調査の様子。

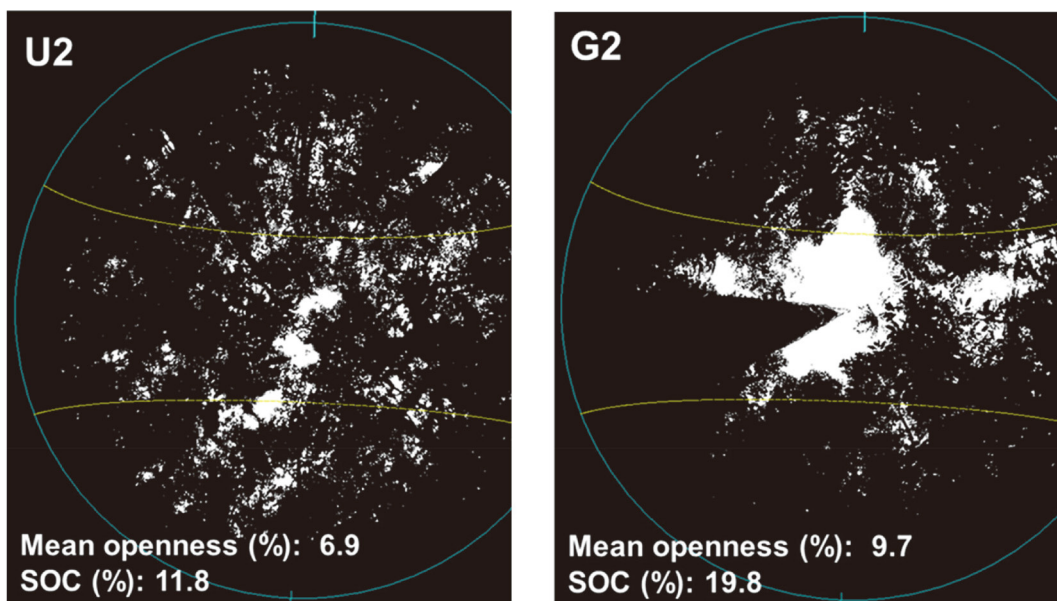


図4 各プロットの中央で、視野角180°の魚眼レンズを用いて天頂に向かって全天を撮影した一例(2016年1月25日撮影)。写真の白色部分が、林冠の開けた部分を示す。写真上方が北を示す。林床(U2、左)とギャップ(G2、右)における林冠の平均開空度(Mean openness: %)と、光強度の相対散乱光(SOC: %)を算出した。黄色線は、それぞれ夏至と冬至の太陽軌道を示す。全天写真の解析にはCanoPon 2を用いた(<http://takenaka-akio.org/etc/canopon2/>)。

2.1.2.2 微環境変動にตอบสนองする植物機能特性の観測

異なる耐陰性の樹種における光合成応答性を比較するため、林床稚樹のモニタリング結果や文献調査の結果などに基づいて耐陰性の高い樹種と低い樹種、それぞれ3種を選び、実験対象にした(図5)。

光合成誘導反応の測定対象には成熟した葉を用いた。光合成誘導状態(光合成活性化程度)を揃えるため、測定する前に $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の PPFD 条件下で順化させ、安定した光合成速度に到達してから PPFD を $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に上昇し、30分間に渡って光合成速度の変化過程を記録した。図6は、測定条件の詳しい情報を示す。

イソプレンを含む BVOC は熱帯林内部の林床に生育する上記6種に加え、林縁部、林外の新耐陰種について実施した。実験は標準的な一定環境条件と光強度を変化させた誘導条件の2種類で行った。標準条件の実験は、PPFD、気温、 CO_2 濃度が、それぞれ $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 30°C 、400 ppm の条件で行った。誘導条件での実験は、PPFD を 50、100、250、500、1000、2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と段階的に変化させ(各段階で12分間保持)、各段階で BVOC のための試料採取を行った。BVOC 測定のための試料は、携帯型光合成蒸散測定装置と試料採取容器(ガラスフラスコおよび吸着管)を組み合わせた装置により採取し、試料の分析には大気濃縮装置/ガスクロマトグラフ/質量分析計を用いた(図7)。

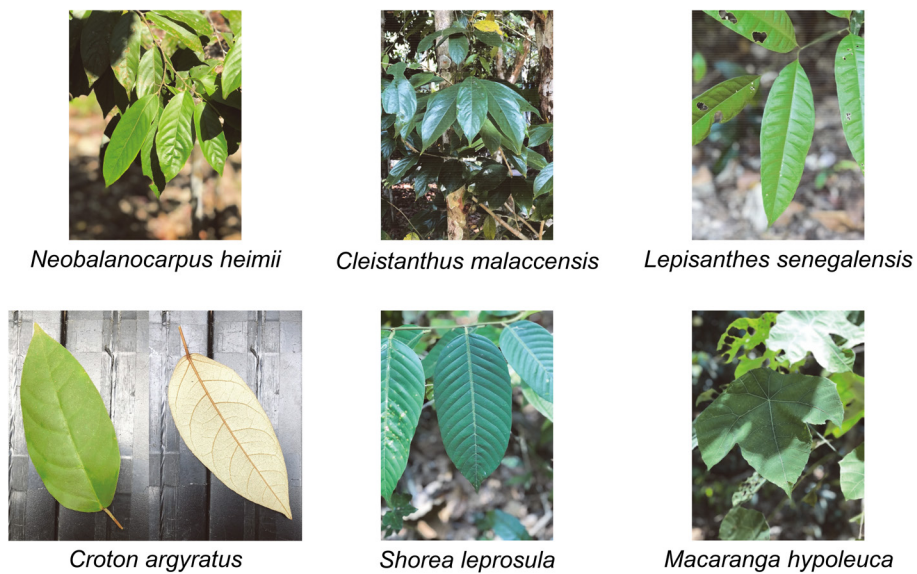
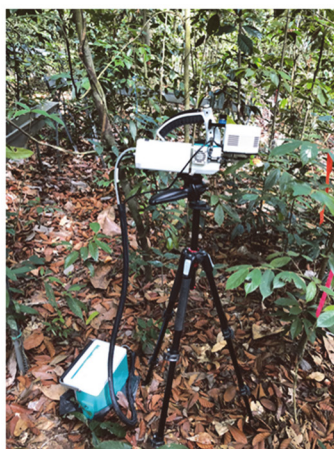


図5 本研究で実験対象とした異なる耐陰性を持つ植物葉の形態。図中の上部の3種は耐陰種、下部の3種は非耐陰種の葉を示す。



測定条件	設定値
流量	$350 \mu\text{mol s}^{-1}$
チャンバー内圧力	0.1 kPa
湿度	RH \approx 75%
二酸化炭素濃度	$400 \mu\text{mol mol}^{-1}$
Fanの速度	8000 rpm
チャンバー内気温	$T_{\text{xchg}} = 30^\circ\text{C}$
光合成光量子密度の変化	$50 \rightarrow 1000 \rightarrow 50$ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

図6 光合成誘導反応測定風景(左写真)と測定条件。



図7 パソ森林保護区内に設置した大気濃縮装置 / ガスクロマトグラフ / 質量分析計。

2.1.3 結果と考察

2.1.3.1 林床の微環境と植生の追跡調査

2.1.3.1.1 林床の微環境

プロジェクト全期間を通して70%の期間でデータを獲得した。2014～2017年に観測されたデータを解析した結果、ギャップの方が林床より気温も土壌温度も高く、変動も大きかった（図8）。また、熱帯林内では1月ごろの気温が最も低く、5月ごろに最も高い傾向が示された。

図9は測定期間中のギャップと林床の平均温度の日変化を示す。測定地点によって平均温度は異なっていたが、地温・気温は共にG1, G2地点での日較差が大きいことが分かった。G3地点では日較差が大きくなかったがギャップ地点の中では最も林冠開度が小さく通常林床に近かったためであると考えられる。温度が最大になる時間は、ギャップ地点で早まる傾向が得られた。これは、ギャップ地点で地上まで日射エネルギーが到達することにより気温が上昇した後、ギャップ地点の周辺に熱が水平輸送されるメカニズムが存在するものと考えられる。逆に夜間ではギャップ地点での最低温度が遅くなる傾向が見られた。夜間は放射冷却により温度が低下していくが、夜間冷却が高い林冠開度を通して継続することが考えられる。

パソ森林保護区の林床では、日中の7割以上の時間帯が光合成に適さない暗い光環境(PPFDが $16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 未満)であった。一方で、晴天時にはPPFDが $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を超える直射日光の一部が林冠内部へ浸透し、林床にサンフレックとなって差し込んでいた。また、林冠の開空度が17.3%から4.5%（2016年6月）の範囲で変化し、年次ごとに減少する傾向が明らかになった。特にギャップ地点においてその傾向は顕著であった（図10）。

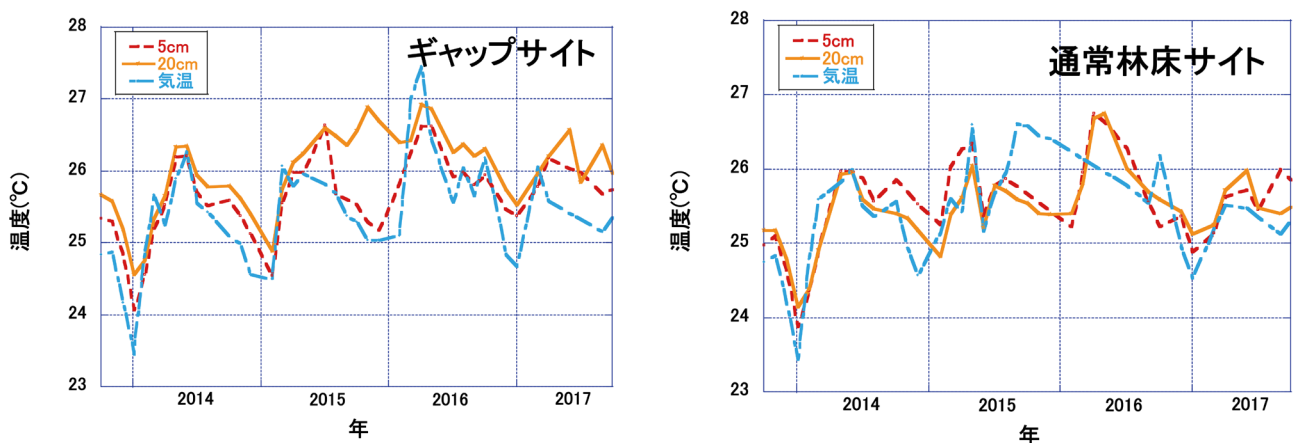


図8 マレーシア熱帯林内のギャップ（左図）と林床（右図）における気温と土壌温度の月平均値。

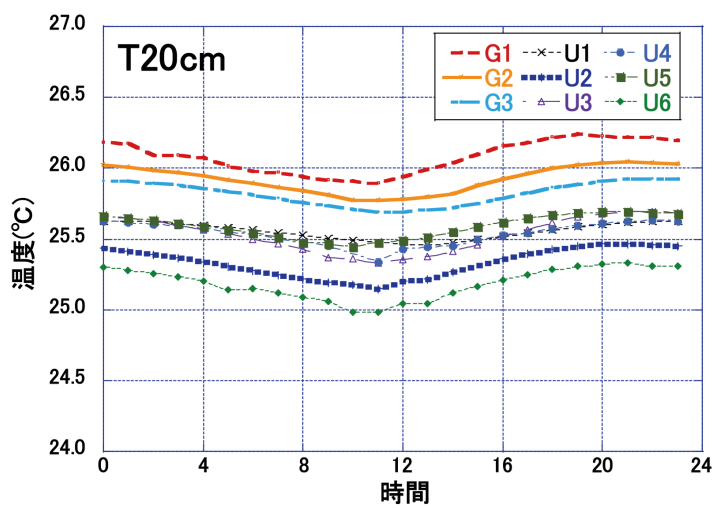
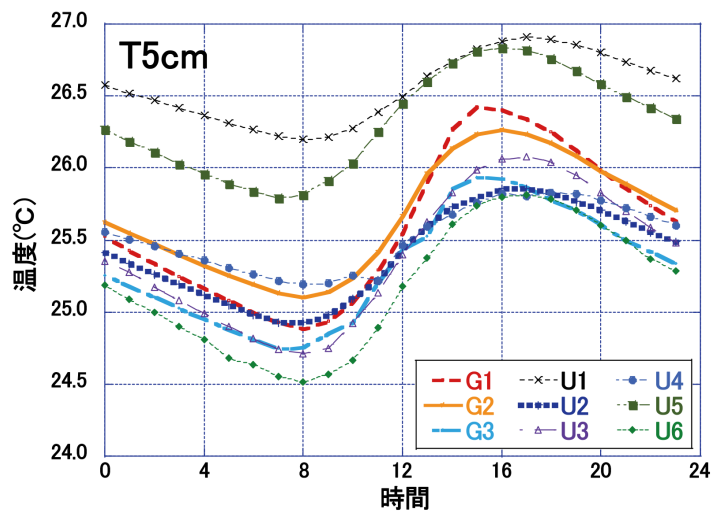
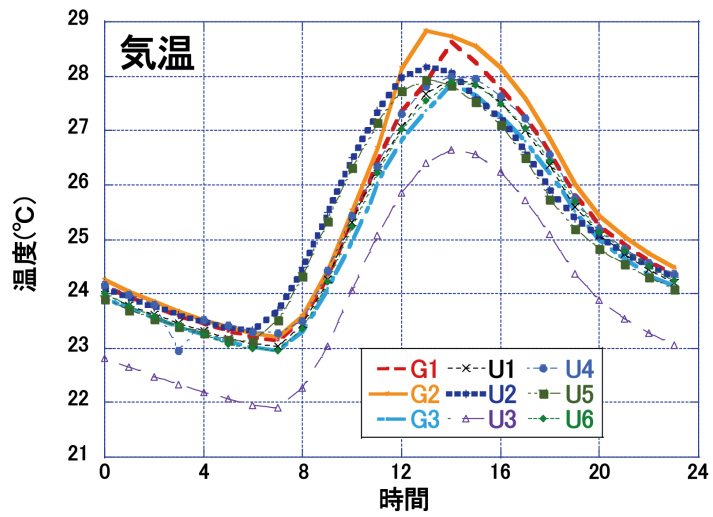


図9 熱帯林ギャップ (G1 から G3) と林床 (U1 から U6) の異なる観測サイトにおける気温、5 cm 地温と 20 cm 地温の平均日変化。

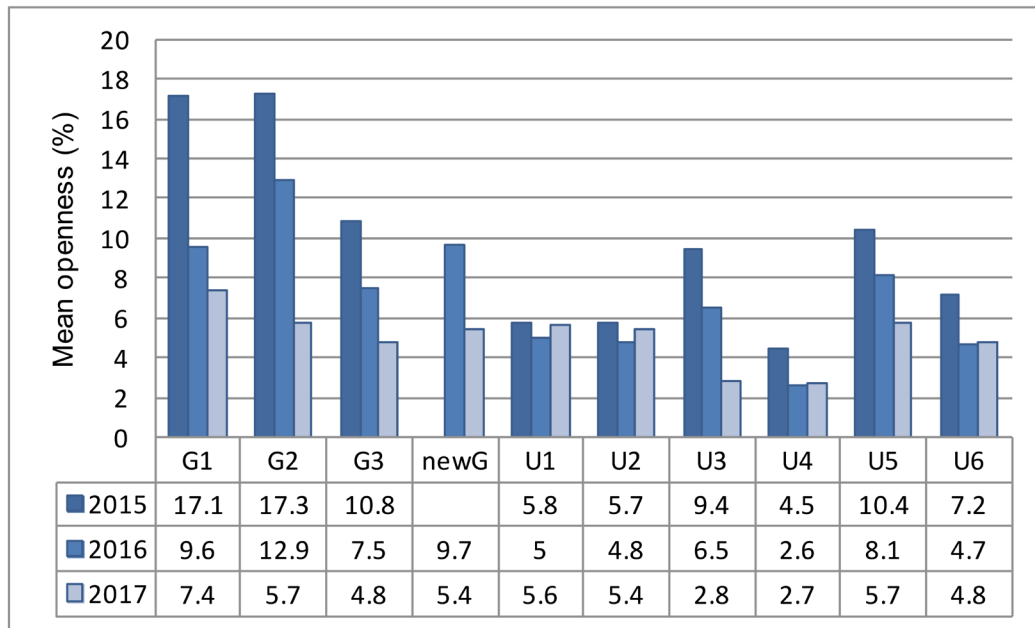


図 10 ギャップ (G) と林床 (U) における植生調査プロット中央における林冠開空度の年次変化 (2015-2017)。

2.1.3.1.2 実生と稚樹の追跡調査

図 11 には、モニタリングによって得られた現存する個体数と植物種数の経年変化をプロット毎に示した。現存個体数と植物種数のいずれも、2015 年以降、年次を追って減少する傾向が認められた。これは、2014 年 4 月にマレーシア半島部で大規模な一斉開花現象が発生したことと関係している。すなわち、大量に供給された種子から 2015 年に多くの実生が発芽・発生し、その後一部が淘汰された様子を捉えたものと考えられる。なお、2015 年から 2018 年の現存平均個体数は、ギャップサイトで 54 から 37、林床サイトで 121 から 77 へとそれぞれ約 35% 減少し、平均出現植物種数は、ギャップサイトで 22 から 18、林床サイトで 35 から 29 へとそれぞれ約 18% 減少した。平均樹高は、ギャップサイトで 15.8 cm から 45.6 cm へと約 30 cm 伸長し、林床サイトでは 16.4 cm から 25.4 cm へと約 10 cm 伸長した。特にギャップサイトでの実生の生長速度は、林冠下の林床サイトより 3 倍近く速く、光資源の利用可能性が重要であることが示された。

また、4 年間の追跡調査からは実生の生残が種特異的であることが明らかになった。例えば個体数が多かった種は、4 年間で個体数を大きく減らす傾向を示した。この個体数の変化が、どのような環境要因によるのかについては、更なるデータの蓄積が必要である。今後も林床環境や稚樹の種構成のモニタリングを継続し、各環境要因と森林更新の関係性を解明していくことで、熱帯森林生態系の構造と機能に対し、気候変動がおよぼす影響を評価することが可能となる。

2.1.3.2 耐陰性が異なる樹種における光合成誘導反応の特徴

2.1.3.2.1 光照射に対する光合成応答と耐陰性の関係

図 12 は、耐陰性が異なる樹種 6 種における光強度に対する光合成速度と気孔コンダクタンス (気孔の開き具合を表すパラメータ) の時間変化を示す。光強度を $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に上げると、どの樹種も光合成速度は急速に上昇したが、気孔コンダクタンスは比較的緩やかに上昇することが示された。PPFD が $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では、6 つの樹種の光合成速度はいずれも $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 前後で、大差がなかった。しかし、PPFD が $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では、耐陰性の高い樹種 (以下、陰樹とする。) では光合成速度が低かった (約 $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) のに対して、耐陰性が低い樹種 (以下、陽樹とする。) では、光合成速度が 3 ~ 4 倍も高かった。気孔コンダクタンスにおいても、光合成速度の変化と同様な種による違いがみられた。これらのことから、樹種の耐陰性によって光合成誘導反応の光合成速度と気孔コンダクタンスが大きく異なり、陽樹は迅速な光応答性により、光照射に対する炭素獲得量が高いことがわかつ

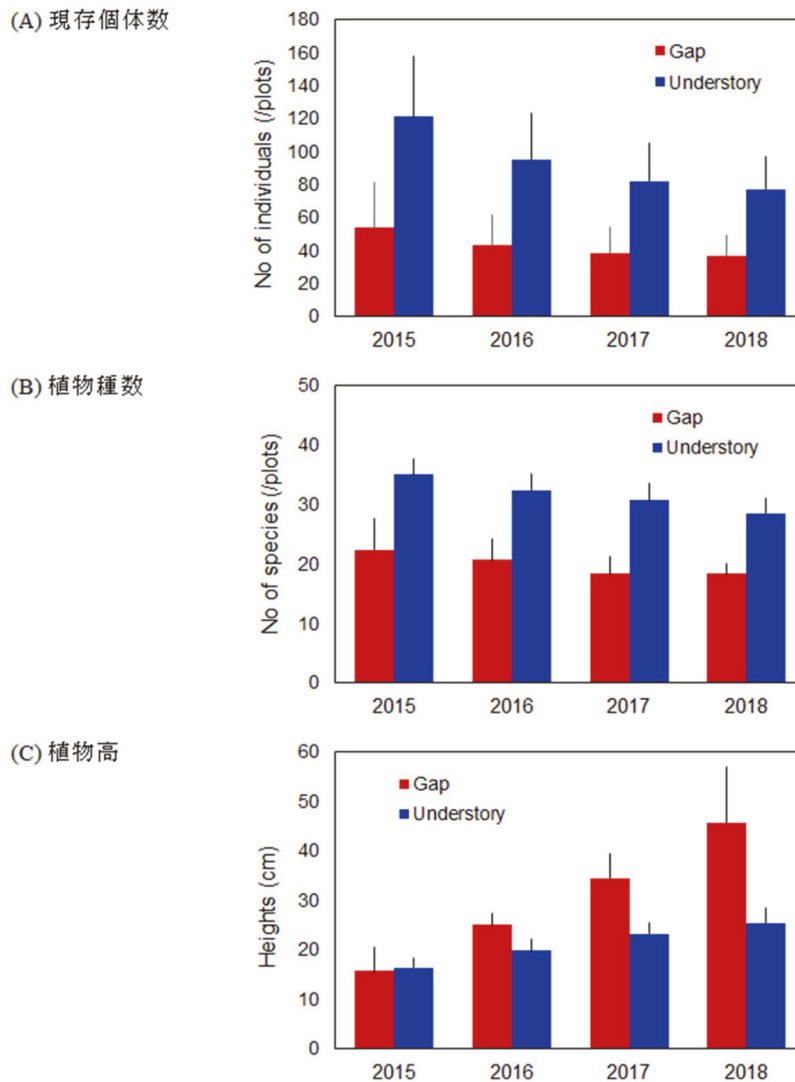


図 11 林床とギャップの各プロットにおける現存個体数 (A)、植物種数 (B)、植物高 (C) の年次変化。林床 (Understory) とギャップ (Gap) の各棒グラフは、それぞれプロット (U1 ~ U6) 平均値とプロット (G1 ~ G3) の平均値を示す。

た。また、そのメカニズムとして、初期の気孔開度、すなわち気孔コンダクタンスが陰樹に比べて陽樹において相対的に高く、光に対する反応性を高めていることが推測された (図 13)。

2.1.3.2.2 稚樹の生育環境の明るさと光合成誘導反応速度の関係

ここでは、光合成誘導反応過程の違いが樹種の耐陰性によるものか、あるいは生育した場所の光環境に依存するかを明らかにするため、光合成誘導反応の応答速度を稚樹生育場所の光強度と比較した (図 14)。この図は、稚樹の生育場所における微環境の明るさの指標であるサンフレックパーセント (全天写真から推定) と、稚樹の光合成速度が最大値の 50% に到達するまでの時間 ($IT_{50\%}$) の関係を表している。この解析から、陰樹は陽樹よりも $IT_{50\%}$ が高く、応答が遅いことが示された。 $IT_{50\%}$ は、生育した場所の明るさの指標が高いほど高くなるが、陽樹では生育場所の明るさの指標が 15% 程度以上になるとほぼ変わらなかった。ANOVA の分析では、光合成誘導反応時間の変動に対して、樹種の耐陰性より生育場所の PPFD の寄与が高いこともわかった (表 1)。

以上の結果から、光合成誘導反応速度は樹種だけでなく、生育場所の光環境にも依存することがわかった。また、陽樹より陰樹の方が光合成誘導反応速度が遅く、しかも、明るい生育環境では光合成誘導反応速度も低いことがわかった。これは、従来の多くの研究結果と異なる結果である。

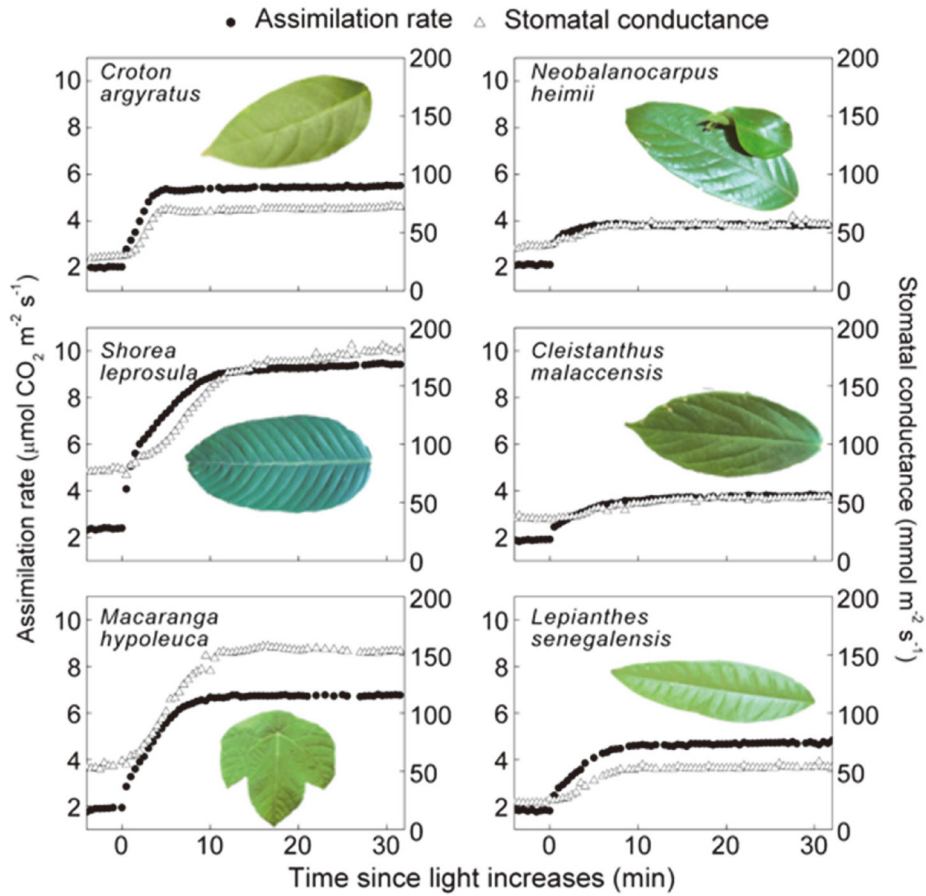


図 12 異なる耐陰性樹種の光合成誘導反応過程における光合成速度（黒丸）と気孔コンダクタンス（三角）の時間変化（左：陽樹；右列：陰樹）

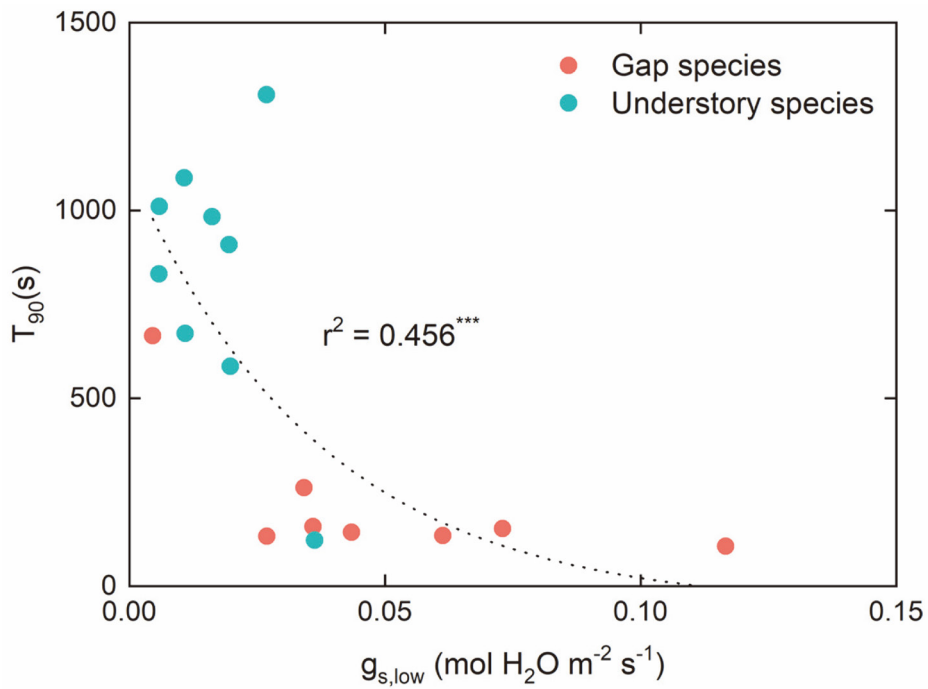


図 13 気孔コンダクタンス ($g_{s,low}$) に対する光合成応答速度の指標（最大光合成速度の 90% に到達するまでの時間、 T ）。初期の気孔開度が低いほど、光照射に対する光合成応答性が低い。

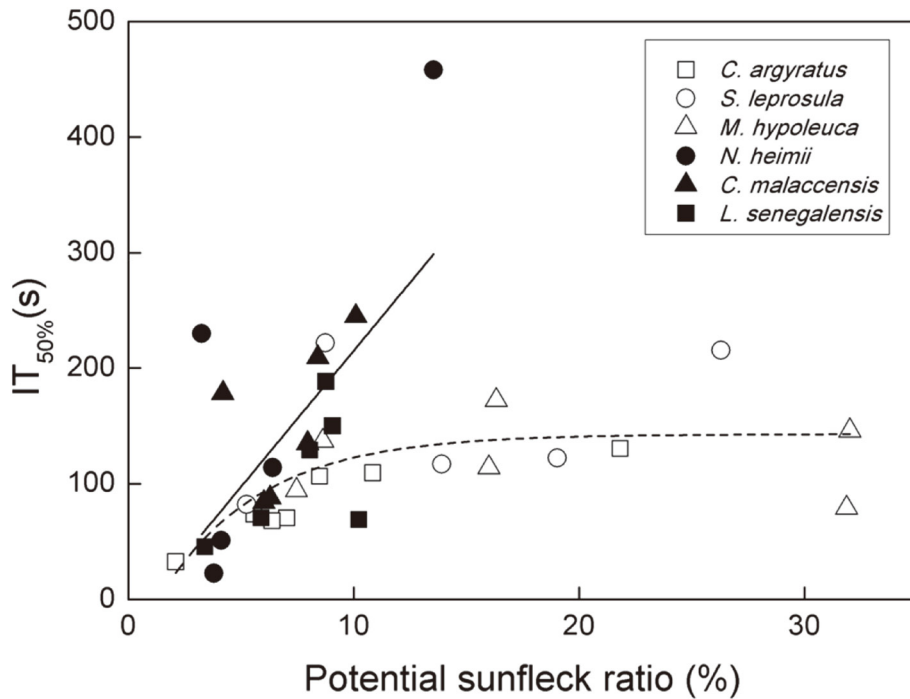


図 14 稚樹の生育場所における明るさの指標（サンフレックパーセント）と稚樹の光合成誘導反応速度の指標（ $IT_{50\%}$ ）との関係。 $IT_{50\%}$ はPPFDが50から $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に上昇してから最大光合成速度の50%に到達するまでの時間を表す。図の白抜き点は陽樹、黒い点は陰樹についての結果を表す。

表 1 ANOVA 分析結果。数字はF値、***, **, *はそれぞれ $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$ を示す。 A_{1000} 、 $IT_{50\%}$ 、 $ITG_{90\%}$ はそれぞれ $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 下で安定した光合成速度、その光合成速度の50%に達する時の時間、およびそのPPFDの下で最大気孔コンダクタンスの90%に達する時間

	因子		
	耐陰性	サンフレックパーセント	耐陰性 x サンフレックパーセント
A_{1000}	55.1***	33.1***	8.3**
$IT_{50\%}$	2.1	7.4*	1.7
$ITG_{90\%}$	1.0	2.1	0

2.1.3.2.3 サンフレックに起因する葉温の上昇と光合成誘導反応の関係

サンフレックのような強い光照射は葉温の上昇を引き起こす。そこでまず、サンフレックが引き起こす葉温の上昇程度は樹種の耐陰性と関係するのかを調べた。図 15 には、サンフレックを模擬した光強度の急激な上昇時における葉温の変化を、代表的な陰樹と陽樹について行った結果を示す。この結果から、最初の約 30 秒間において陽葉と陰葉の葉温は同じように上昇するが、その後の葉温の低下は、陰樹より陽樹の方が大きいことが示された。しかしこの現象が陽樹一般に拡張できるのか、また葉温低下をもたらしたメカニズムについては不明である。

続いて、葉温の変化が光合成誘導反応にどのように影響するかを調べた。実験は、葉温一定（ 30°C および 40°C ）と葉温可変（ 30°C から 40°C ）の条件で行った。誘導状態は、PPFDが $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時の光合成速度に対する各光

合成速度の割合である。その結果、光合成誘導状態は葉温一定の場合より葉温が上昇する場合に高くなることがわかった (図 16)。この結果は、サンフレックのような変動光条件下における葉温の上昇は、光合成誘導反応を大きく加速することを示している。

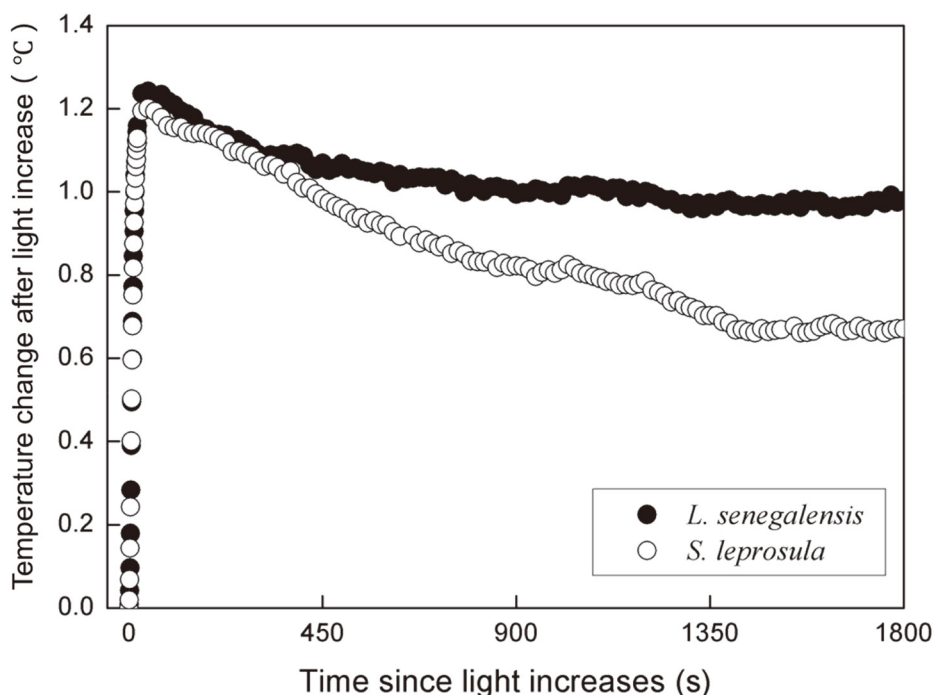


図 15 PPF D の上昇 (50 から 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 後に観測された葉温の変化。代表的な陰樹 (*L. senegalensis*) と陽樹 (*S. leprosula*) の結果を示す。

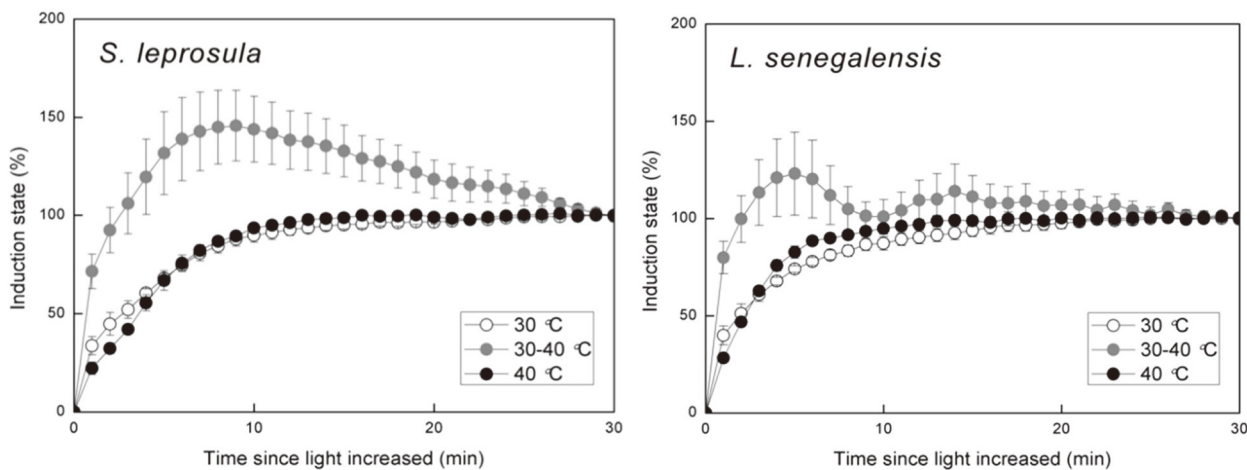


図 16 異なる葉温条件における光合成誘導状態の変化。縦軸の光合成誘導状態は、PPFD が 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下における光合成速度に対する光合成速度の割合。実験は、葉温一定 (30 °C および 40 °C) と葉温可変 (30 °C から 40 °C に上昇) の条件で行った。左の図は陽樹 (*S. leprosula*)、右は陰樹 (*L. senegalensis*) についての結果を示す。

2.1.3.3 イソプレンの放出と光環境の関係

まず、標準条件下において BVOC の測定を行い、放出量の樹種依存性を調べた。その結果、前節で実験対象にした 6 種のうち、*M. hypoleuca* においてのみイソプレンの放出が認められた。なお、イソペン以外の放出は認められなかった。一方、林内のギャップサイトなどに生育する陽樹である *C. argyratus* や *S. leprosula* にはイソプレンの放出が認められなかったことから、これらの種はサンフレックによる葉温上昇に対してイソペンによる葉温低下機能を利用していないことがわかった。

唯一イソプレンの放出が認められた *M. hypoleuca* は熱帯林内よりも明るい林縁部などに生育している典型的なパイオニア種であり、*M. hypoleuca* を含むマカラング（トウダイグサ科オオバギ属）はパソ森林保護区の林内から林縁部、林外まで異なる光環境に広く分布している。そこで、マカラングを対象にイソペン放出能と光環境（実生や稚樹の生育場所における林冠の開空度）との関係を調べた。その結果、イソプレンの放出は林冠開空度が 10 ~ 30% 程度の光環境に生育する 2 種で認められた（図 17）。10 ~ 30% 程度の開空度は一般に林縁部の周辺で見られるため、イソペン放出能は光環境が大きく変化する林縁部の光環境と関係している可能性が示唆される。しかし、実験対象が限られているため一般化するためには今後更に調査を行う必要がある。

続いて、光強度の変化に対するイソペン放出速度の影響を調べた。実験には代表的なマカラングである *M. gigantia* の実生および稚樹（各 3 個体）を用い、光強度を $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ まで段階的に変化させながら光合成速度とイソペン放出量を測定した。図 18 には実験の一例として段階的に変化させた光強度に対する光合成速

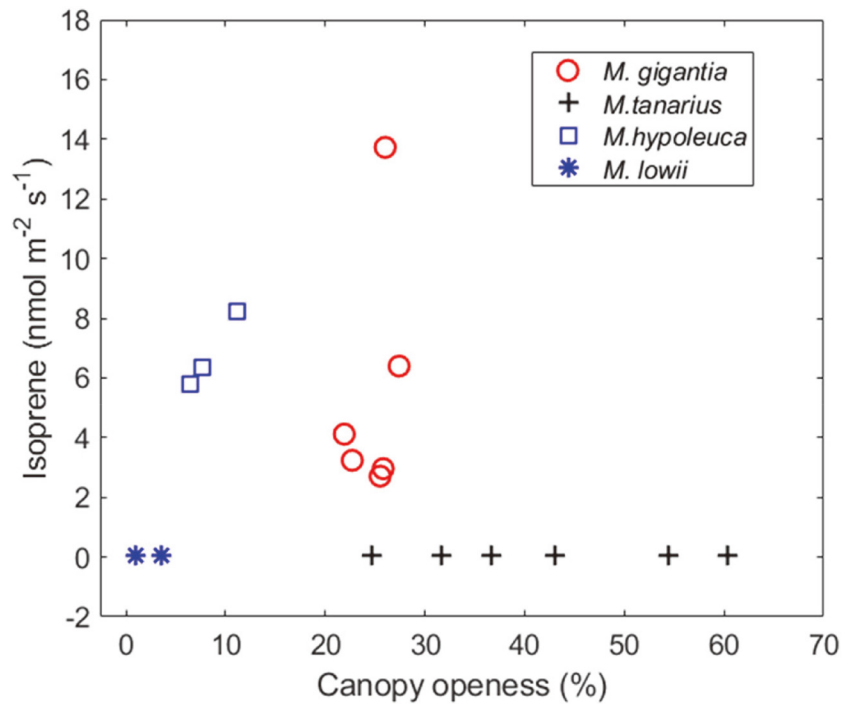


図 17 マカラング（トウダイグサ科オオバギ属）の生育場所における林冠開空度と標準条件におけるイソペン放出速度の関係。

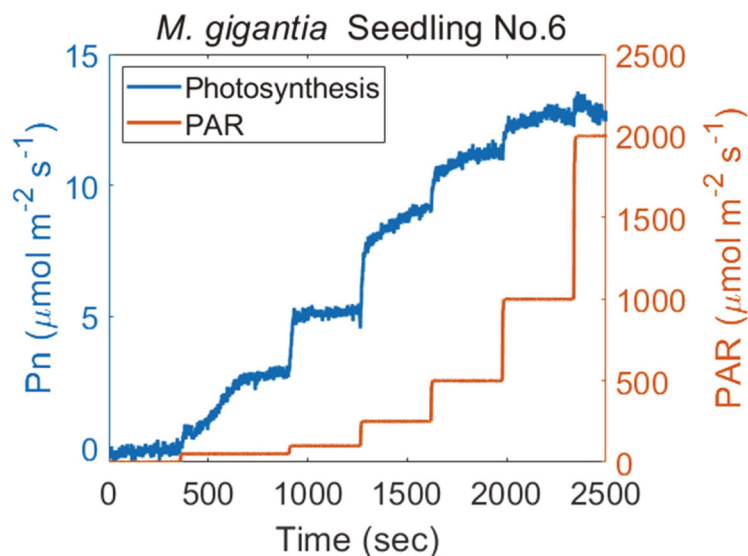


図 18 光強度の変化に対する光合成速度 (Pn) の応答。

度の変化を示した。イソプレン測定のためのサンプルは各段階で採取し、オフラインで分析した。その結果、光合成速度は $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で頭打ちとなる一般的な飽和カーブが見られた。一方、イソプレン放出速度はいずれの個体においても $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で頭打ちせず、 $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で最大の放出速度を示した (図 19)。しかし、光強度に対する応答特性は個体ごとに異なっており、稚樹の 2 個体では $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ にかけて急激にイソプレン放出速度が高くなるというパターンが観測された。これは既存のイソプレン放出モデルで予測されるパターンとは異なっている。こうした特異な応答性がどのような条件で発生するのか、今後更なる研究を行う必要がある。

以上の結果から、林縁部などに生育するマカラングはイソプレンを放出しており、特に強光下においてイソプレンへの炭素の投資を大きくしていることがわかった。林縁部は光環境が最もダイナミックに変動する環境であり、その光環境変動に対する応答として高温耐性のためにイソプレンを利用していることが示唆された。

2.1.4 サブテーマ 1 のまとめ

本サブテーマでは、異なる微環境下における植物の機能的な多様性を明らかにすることを目的として、パソ森林保護区において微環境および植物のモニタリングと植物の生理機能特性の観測を実施した。その結果、以下の事柄が明らかとなった：

- (1) 林内における実生の追跡調査から、ギャップサイトにおける実生の成長速度は林冠下の林床より 3 倍近く速く、光資源の利用可能性が重要であることが示された。
- (2) ギャップと林床という異なる微環境における生理機能的な多様性として、気孔開度、最大光合成速度、光強度の変化に対する光合成応答速度があることがわかった。

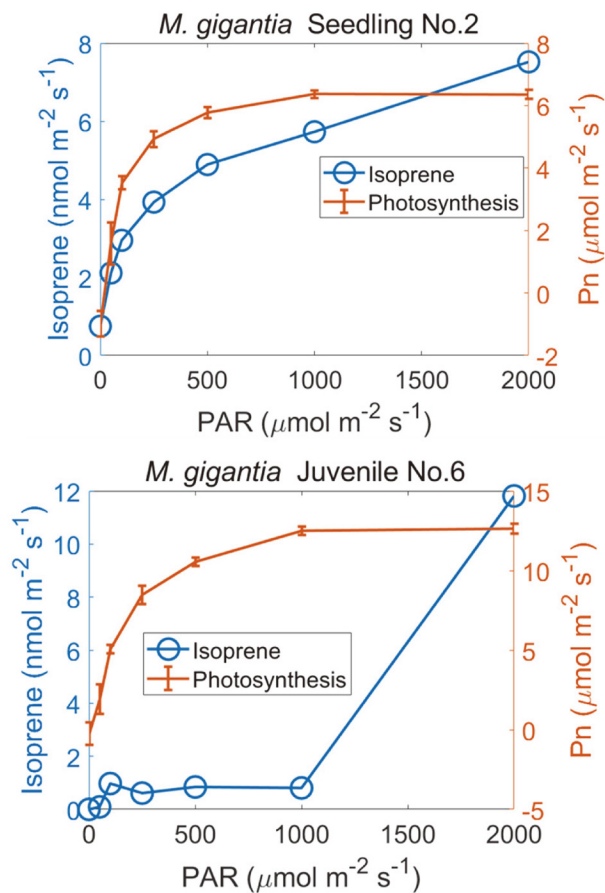


図 19 光強度 (PAR) の変化に対するイソプレン放出速度と光合成速度 (Pn) の変化。実験は *M. gigantia* の実生 (上図) および稚樹 (下図) に対して行った。

(3) マレーシアの代表的な非耐陰種であるマカランガ属は、光環境が最もダイナミックに変動する林縁部の微環境に
応答するため、イソプレンの放出という植物生理機能 (= 高温耐性) を獲得した可能性が示唆された。

本サブテーマで明らかになった林縁部の微環境 (強光) とイソペン放出の関係は、今後他の熱帯林サイトで検証・
評価されることにより、なぜ一部の種のみが固定した炭素の一部をイソペンに分配しているかの解明に繋がると期待
される。今後、農地化などによる熱帯林の破壊 (= 林縁部の増加) に対して植物がどう応答するのか、また温室効果気
体であるオゾンの生成に繋がるイソプレンの放出は森林破壊と気候変動の相互作用においてどのような役割を持つのか
を考える上で、本研究で開発したイソペンを含む機能特性のモニタリング手法が活用できると期待される。

引用文献

- 1) Yamada T., Yoshioka A., Mazlan H., Liang N. & Okuda T. (2014) Spatial and temporal variations in the light environment in a primary and selectively logged forest long after logging in Peninsular Malaysia. *Trees* 28:1355-1365.
- 2) Ohkubo S., Kosugi Y., Takanashi S., Matsuo N., Tani M. & Abdul Rahim N. (2008) Vertical profiles and storage fluxes of CO₂, heat, and water in a tropical rainforest at Pasoh, Peninsular Malaysia. *Tellus* 60B:569-582.
- 3) Sasaki, K., T. Saito, et al. (2007). "Plants utilize isoprene emission as a thermotolerance mechanism." *Plant and Cell Physiology* 48(9): 1254-1262.

2.2 サブテーマ2 低高度リモセン技術を用いた林冠3D構造の復元手法と生物多様性指標の開発

2.2.1 目的と経緯

熱帯林生態系は、地球上の生物多様性のホットスポットであるが、気候変動や人為的な影響により劣化や消失はこれまで急速に起きており、熱帯林生態系の生物多様性のモニタリングは急務である。しかしながら、生物多様性の評価は、野外での直接的な調査が不可欠であるため、局所的なデータに限られているのが現状である。生物多様性観測の広域化のためには、人工衛星などのリモートセンシング技術を用いることが有効であると考えられるが、解像度の問題や、リモートセンシングデータから算出できる生物多様性の指標について理解が進んでいないことから、これまで生物多様性の広域観測は進んでいない。

森林の構造は、林内の光条件の異質性を決定し、ひいては林内に生息する動植物の群集や分布に影響を与える。特に熱帯林は、林冠高が高く階層構造が発達した森林であり、垂直方向にも異質な環境ニッチを形成することからも、森林構造が種多様性維持を決定する要因の一つであると考えられる。鳥類においては、林冠の葉群密度が高いほど、林内の種数が増えることがこれまでよく知られている¹⁾。森林の樹木群集においては、高い林冠をもつ森林であるほど種多様性が高いことが予測されている（森林構造仮説²⁾）。この仮説では、森林内では光資源をめぐる激しい競争が起きるものの、樹種間の形質である最大樹高と繁殖形質とのトレードオフによって、多種共存が可能となるとしている。これまで実証に至った研究例は限られているものの、熱帯樹種においては最大樹高と繁殖形質とのトレードオフは報告されており³⁾、こういった光をめぐる競争と形質のトレードオフ関係が森林の垂直方向の複雑性と光環境の異質性と相まって種多様性を決定していると考えられる。

林冠高や森林の階層の計測調査は、解像度やコストの問題がある。林床からのレーザーを用いた計測は、解像度の高いデータが得られるものの、計測範囲が小面積に限定される上、レーザー機器はコストが高いため広く利用されているとは言えない。有人飛行による空撮やレーザー照射は、より広い面積をカバーできるものの数千万円単位のコストがかかるため、実施のハードルは高い。人工衛星ライダーなどを用いた計測は、コストは低く広域面積を対象とできるものの、特定の地点での計測は難しい。このように、従来森林高の計測には、空間スケール、解像度、運用コストなどの問題があり、森林の樹木群集の種多様性と詳細な林冠構造を関連付けた研究は限られている。

近年、無人航空機（UAV）の技術の進歩と低価格化により、UAVにカメラやセンサーを搭載することで近接リモートセンシングのプラットフォームとして手軽に利用できるようになりつつある⁴⁾。さらに、複数枚の画像から3次元形状とカメラの位置を同時に復元する画像解析の技術（Structure from Motion、SfM）の発展も伴って⁵⁾、高価なレーザーに頼らず消費者レベルの安価なカメラで空撮した画像で、樹高や林冠表面構造の解析が可能となっている。これらの技術を熱帯林の林冠構造の観測でも利用することができれば、前述の問題のブレークスルーとなることが期待される。

そこで本研究では、林冠の写真から熱帯林の林冠構造を再現する技術の有効性を確認した上で、林冠構造と種多様性の関係を明らかにすることを目的とした。具体的には、マレーシア熱帯原生林を対象として、森林を上空からUAVで撮影し、SfM技術を用いて3Dの林冠構造を復元する。林冠構造と種多様性の相関を統計解析し、森林構造仮説で予測される林冠構造と種多様性の正の相関関係の検証を行う。またこの時、林冠構造と種多様性の指標についても複数検討して、より感度の良い指標を選定する。

2.2.2 方法

2.2.2.1 調査地

調査は、マレーシア・ネグリシンプラン州のパソ森林保護区（2°59'N、102°18'E、標高75-150 m）で行った。パソ森林保護区の年間降水量平均、年間平均気温はそれぞれ1833 mm、25.4℃である。植生タイプはマレーシアにおいて典型的な低地フタバガキ混交林であり、トウダイグサ科、フタバガキ科が優先する。本研究では、保護区内に設置された原生林の6 ha 試験地を対象とした。試験地内は、胸高直径5 cm以内の樹木である個体がすべてタグづけされており、2016年の調査では約8600個体、約580種が確認されている（新山ら、未発表）。また、試験地内には、フラックス観測や林冠観察のための3つの林冠タワーとその間を結ぶ回廊が設置されている。野外調査およびUAV飛行は、2016年

9月2-10日、2017年8月30日-9月10日、2019年2月18-25日の3期間行った。

2.2.2.2 地上調査：地形・GCPの設置

2.2.2.2.1 地形調査

2017年8月30日-9月3日に、トラバース測量によって地形の測定を行った。6 ha 試験地内の10 m ごとに設置されている杭の近接地点間で、ポケットコンパス、レーザー距離計（True Pulse、Trimble社）により、距離、方位、傾斜角を測定した（図20）。



図20 True Pulseによるトラバース 測量の風景。

2.2.2.2.2 基準点（Ground Control Point、GCP）の設置

SfM手法での数値表層モデル（Digital Surface Model、DSM）の精度を検証するため UAV の飛行前に GCP の座標を設置した。UAV からの空撮写真に映り込むように、林内のギャップに白板（20 cm × 20 cm）を30個設置し（図21）、その中心点を GCP とした（図22）。なお、GCP の設置は UAV の飛行の1～3日前に行ったが、UAV 飛行するまでに、倒木やサルによる白板の移動や破壊があり使用できない箇所は記録して除外した。Global Navigation Satellite System（GNSS）測量は、Trimble社 Geo7x を用いて少なくとも200秒間 GPS 人工衛星の搬送波を受信させ記録した。なお、得られた GNSS データは、マレーシアの地理院により公開されている調査地から近い2つの電子基準点の同時受信情報を用いて補正した。補正にはオープンソースのソフト（RTKlib34）を用いた。



図21 6 ha 調査区における GCP の位置





図22 GCP（白板）上での GNSS 測量の様子

2.2.2.3 UAVによる森林空撮の最適条件の検索

2.2.2.3.1 UAV仕様および飛行コース

本研究で使用したUAVは、Hornbill Surveys社（マレーシア）によるカスタムメイドモデルHBS（以下、HBS）とDJI社のMatrice 600 Pro（以下、Matrice）である（表2）。両UAVともソフトウェアによるオートパイロットが可能であり、決まったコースで自動撮影が可能である。今回の撮影の撮影高度は、発着プラットフォームから約120-150 m（試験地の最大樹木高度から約60-80 m）とし、オーバーラップ60%以上、サイドラップ30%以上となるように飛行コースを設定した（図23）。

表2 本研究で用いたUAV仕様の比較。2016、2017年はHBS、2019年はMatriceを用いた。

UAV	カスタムメイドHBS	Matrice 600 pro
		
積載重量	最大2.5kg	最大6kg
滞空時間 (積載ゼロ時)	15分程度 (最大30分)	25分程度 (最大38分)

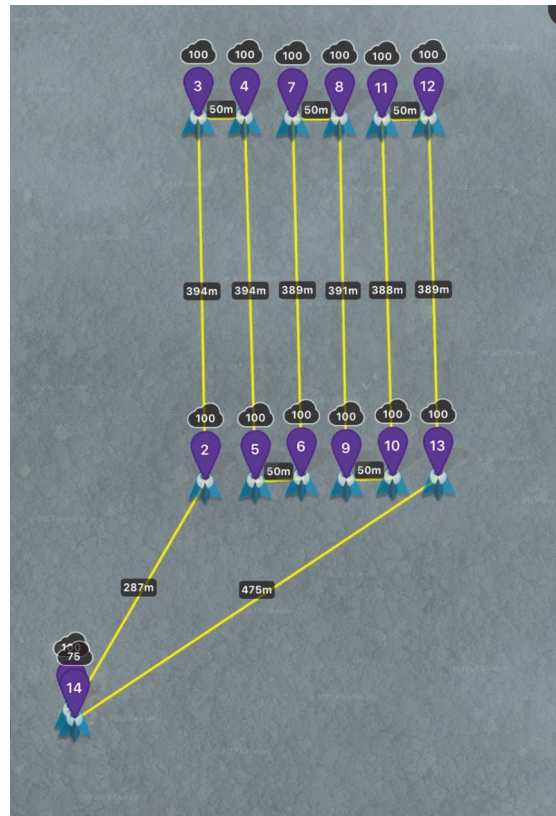


図23 設計したUAVの飛行経路(Matrice、2019年)。HBSの場合は、滞空時間が短いため2回に分けた飛行が必要となる。

2.2.2.3.2 UAVの発着プラットフォーム

熱帯林における UAV の利用における課題の一つに、安全性に配慮した運用がある。高木層の林冠をもち、また林冠が閉鎖している熱帯原生林では、UAV とリモコンとの通信の確保や目視での UAV の飛行の確認、森林内での発着プラットフォームの確保が困難であった。予備研究の段階においては UAV の発着場所を試験地内のタワー上とした。タワー上は、通信状態がよいこと、対象区までの移動時間が必要ないため、飛行時間を節約できるといったメリットがある。一方、タワー上では発着スペースが限られているため、UAV 発着時のリスクは考慮する必要がある。予備研究において用いた小型 UAV (DJI Phantom 2 vision+) の場合は、軽量でサイズも小さいため、タワー上の発着には問題はなく効率的な運用ができた。しかし、本研究で使用した UAV は、サイズも大きく発着時のリスクが大きいと判断されたため、発着場所は試験地から約 500 m 離れたパソ森林保護区の事務所付近の開けた平坦地とした (図 24)。実際、発着時の問題はなくすべての飛行は成功した。



図 24 UAV 運転の様子。発着プラットフォームは、安全のために平坦で十分な広さがあり、見通しが良い場所を選定した。

2.2.2.3.3 UAVの飛行条件

離陸と着陸以外は自動操縦で行った。また、カメラの向きは直下で撮影を行った。飛行可能な時間は HBS、Matrice それぞれ 15、25 分程度であるため (表 2)、HBS では 2 フライト / コース、Matrice では 1 フライト / コースを行った。カメラは、RICOH GR II (GPS タグなし)、RedEdge (GPS タグあり) を用いた (表 3)。カメラのタイムラプス間隔は、1 枚 / 2 sec、と UAV の飛行スピードは 14 ~ 18 km/h とした。

表 3 本研究で用いたカメラの性能。2016 年 RICOH GR II、2019 年は RedEdge を用いた。

Camera Model	Resolution	Focal Length (mm)	Pixel Size (μm)	GPS	cf. バンド
GR II	4352 x 3264	18.3	5.2 x 5.2	No	
RedEdge	1280 x 960	5.5	3.75 x 3.75	Yes	Blue、Green、Red、Red edge、NIR

2.2.2.4 空撮画像の処理と林冠 3D モデル化

SfM 手法は、多角度から撮影された複数枚の写真を用いて対象物の三次元モデルを復元するとともに、カメラの相対位置と撮影位置を推定する技術である (Hartley & Zisserman 2006)。SfM 手法では、まず SIFT (Scale Invariant Feature Transform) 手法により任意 2 枚の写真から特徴を抽出しマッチング (feature matching) させ、RANSAC (Random sample consensus) を用いて外れ値を除去し、バンドル調整計算 (Iterative Bundle Adjustment Procedure) により対象物の三次元モデルとカメラの撮影位置を推定する。また、マッチングした写真の中の GCP を使用するか、GPS 情報のある写真を用いることで空間情報を与える。これらのアルゴリズムはすべて公開されており、本研究ではこれをまとめて実装された Agisoft 社の Photoscan ソフトおよび後続ソフト Metashape を用いて解析し、林冠のオルソモザイク画像 (写真上の像の位置ズレ、複数の写真を接合した際にできるひずみや色調の補正処理を行った画像) および DSM を作成した (図 25)。

具体的な作業は、1) 写真を読み込み、写真のアライメント作業により写真間の同一点として使用する特徴点と各写

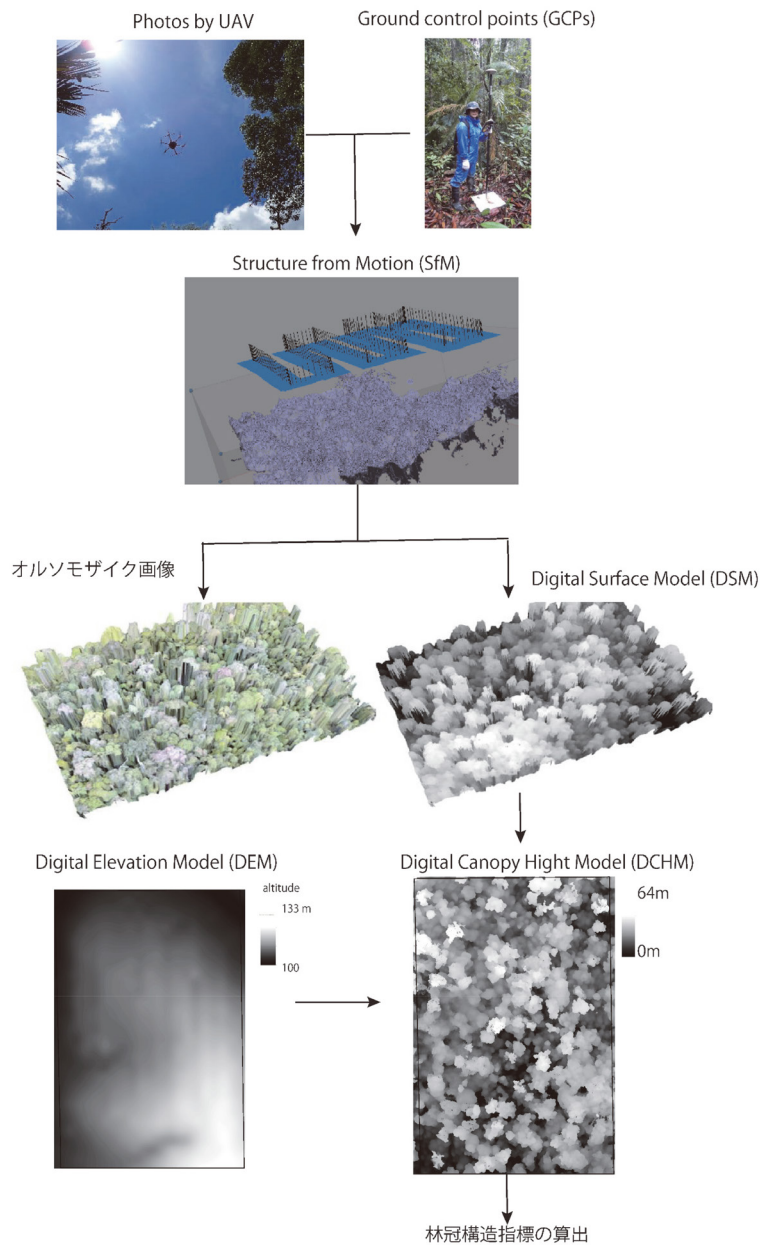


図 25 SfM による DSM、オルソモザイク画像解析と DCHM の作成の手順。

真のオーバーラップから撮影位置を自動的に解析する。ここでは Accuracy を Medium に、Pair preselection を Disabled に Tie point limit を 40000 に設定した。明らかに対象以外あるいは浮いている特徴点がある場合は、Gradual Selection 機能を用いて除去した。2) Dense Cloud により高密度の特徴点を作成する。Quality を Medium に、Advanced Depth filtering を Mild に設定した。3) Build Mesh によりジオメトリを生成した。詳細な三次元モデルを作成するため、Interpolation パラメータを Enabled に設定した。4) 2016 年においては GCP5 点の割り当てによって、仮のジオメトリから地理情報を持つ座標系に変換し、DSM を作成した。2017、2019 年においては、写真に GCP タグがついており、この情報を参照するため、地理情報を持つ座標系への変換の処理は必要ないため行わなかった。

2.2.2.5 ArcGIS 10.6 による解析

2.2.2.5.1 DEM の作成

トラバース測量によって得られた地上の 10m 格子点上の位置と相対的高さ、外周 4 点の GNSS 測量地から、数値標高モデル (Digital Elevation Model、DEM) を作成した。この DEM と、Photoscan で作成した DSM の差分から林冠高モデル (Digital Canopy Height Model、DCHM) を作成した (図 25)。

2.2.2.5.2 精度検証

水平方向 (X, Y) については、SfM 手法で復元されたオルソモザイク画像上の GCP の座標と現地 GNSS 測量の結果を比較し精度評価を行った。その際、2016 年については SfM 手法で使用した 5 点以外の GCP を用いた。鉛直方向 (Z) については、GNSS 測量の値の誤差が大きいため、比較は実施しない。代わりに、UAV からの空撮写真で確認できるタワー 2 点の高さを用いた。タワーの地上からの高さは、メジャーで実測し、最も高いタワー A は 51.9 m、タワー B は 30.9 m であった。

2.2.2.5.3 林冠構造の複雑を表す指標

2016 年の種多様性データとの相関を統計解析するため、2016 年の DCHM を用いて以下の林冠指標を計算した(表 4)。なお、DCHM 値はまず対数変換してから指標の算出に用いた。また、メッシュサイズは 10、20 m を用いた。

表 4 DCHM を用いて得られた林冠構造指標

MAX	林冠高の最大値
MIN	林冠高の最小値
RANGE	林冠高の最大値－最小値
MEAN	林冠高の平均値
SUM	林冠高の総合計
STD	林冠高の標準偏差
Tor	林冠の凹凸 (3D表面積/2D面積比)

2.2.2.6 データ解析

2.2.2.6.1 種多様性指標

2016 年に実施された 6 ha の毎木データより、以下の種多様性指標を算出した (表 5)。メッシュサイズは、上記の林冠構造と同等とした。

表 5 種多様性指標

<i>S</i>	種数
<i>H</i>	シャノン指数
<i>Simp</i>	シンプソン指数
<i>Invsimp</i>	シンプソン指数の逆数
<i>J</i>	均等度

2.2.2.6.2 統計解析

上記で求めた林冠構造の複雑性を示す指標と種多様性の相関関係を統計的に解析した。種多様性は、正の空間的自己相関があることが広く知られており、空間相関の成因を排除するため、条件付自己回帰 (Intrinsic CAR) モデル (角谷 2009) を用いて解析を行なった。本研究での Intrinsic CAR モデルは、線形回帰モデルにランダム効果として空間相関を加えており、以下の統計モデルを構築した。メッシュ *i* について、2016 年における種多様性指数 *j* と林冠構造指標 *l* は、

$$\text{種多様性指数 } [j] [i] \sim a + b_0 * \text{林冠構造指標 } [l] [i] + \rho [i] \quad (1)$$

と表す。ここで *a* は切片、*b*₀ は林冠構造指標の相関係数、 ρ は空間自己相関項を指す。またヌルモデルは、

$$\text{種多様性指数 } [j] [i] \sim a + \rho [i] \quad (2)$$

とした。各パラメータの事後分布の推定は Markov chain Monte Carlo (MCMC) 法の一つであるギブスサンプリングを用いて WinBUGS 1.4.3. により行った (n.chains=3、n.iter=1050000、n.burnin=50000、n.thin=1000)。また、事前分布

は無情報事前分布を適用した。モデルの記述力の評価には DIC (Deviance information criteria) を使用し、ヌルモデルよりも説明力の高いモデル、また最も説明力が高いモデルを選択した。

2.2.3 結果と考察

2.2.3.1 SfMによるDSM、オルソモザイク画像

2016、2017、2019年のDSM、オルソモザイク画像(図26)の生成のために使用した画像数はそれぞれ759、1720、2430枚であった(表6)。解像度はそれぞれ、4.29、6.59、9.13 cm/pixと2016年が一番高く、カメラの性能と飛行高度が関係していると考えられた。また処理にかかった時間は、それぞれ約4日、1日、1日程度であった。2016年のカメラではGPSタグがないため、写真のマッチングから撮影位置の推定が必要で処理時間がかかる一方、GPSタグ有りの2017、2019年は事前情報を得られるため、処理時間の速さは圧倒的に有利であることが考えられた。

表6 各年におけるSfM解析の結果

Year	Number of images	Flying altitude (m)	Ground resolution (cm/pix)	Coverage area (km ²)	Tie points	Projections	Reprojection error (pix)
2016	759	178	4.29	0.278	1991274	6550803	1.19
2017	1720	99.3	6.59	0.154	414056	1369019	1.19
2019	2430	133	9.13	0.124	493909	1905565	1.3

カメラ位置の推定誤差は、2016、2017、2019年のそれぞれ水平方向に2.49、0.94、0.97 m、垂直方向に4.66、0.60、0.59 m、全体としては5.29、1.12、1.13 mあり、2016年が最も推定誤差が大きかった(表7)。これは、2016年は5点のGCPのGNSSから取得したGPS情報をもとに推定誤差を算出している一方で、2017、2019年は写真のGPSタグから推定を行っているため、処理の違いが推定誤差に影響すると考えられた。特にGNSSの推定誤差の影響と、GCPの点数が少ないことが推定誤差を大きくする可能性がある。GCPの数がどこまで推定誤差に影響を与えるかについて検討することは、今後の課題である。

表7 各年におけるカメラ位置推定の誤差の結果

	X error (m)	Y error (m)	Z error (m)	XY error (m)	Total (m)	No. of GCPs
2016	1.61	1.9	4.66	2.49	5.29	5
2017	0.45	0.83	0.6	0.94	1.12	-
2019	0.4	0.88	0.59	0.97	1.13	-

2.2.3.2 林冠3Dモデル化の精度

2016、2017、2019年のDSMの解像度は17.2、26.3、92.4 cm/pixであった(表8)。DSMとDEMの差分をとったDCHMの垂直方向の誤差の結果を表9に示す。2016、2017、2019年のDCHM上のGCPとのGNSS実測値の比較を行った結果、平均3.18、3.54、3.35 m程度であった。一方、垂直方向の誤差は、平均0.45、3.15、-1.3 mと年によって異なっていた(表10)。

2.2.3.3 林冠高の3年間の変化

2016、2017、2019年の6 ha内のDCHMの最大樹高、平均林冠高と標準偏差(SD)、ギャップ率を表11にまとめた。林冠高の平均は28-34 m程度であったのに対して、最大値は2016年の64.8 mが3年の中で最大値であり、2019年の51.9 mが最小値であった。2016、2017年の20 m以下のギャップ率は10~11%であったのに対して、2019年では23.7%に増加していた。2016、2017年はほぼ同じ林冠高であったのに対し、2019年で全体的に林冠高の減少がみられた(表11、図27)。2019年までに大径木の枯死の増加も見られるものの、2019年の垂直方向の精度検証も再度行う必

表 8 DSM の結果

	Resolution (cm/pix)	Point density (points/m ²)
2016	17.2	33.9
2017	26.3	14.4
2019	92.4	1.17

表 9 DCHM 上の GCP と GNSS 実測値との比較による水平方向の誤差

year	points	X error (m)	sd	Y error (m)	sd	Total (m)	sd
2016	19	-1.61	2.1	-0.45	2.36	3.18	1.49
2017	24	1.32	3	1.84	2.06	3.54	2.34
2019	16	1.71	5.65	0.43	1.14	3.35	4.95

表 10 DCHM とタワー 2 点の実測値との比較による垂直方向の誤差

year	points	Z error (m)	sd
2016	2	0.45	0.64
2017	2	3.15	0.49
2019	2	-1.3	0.71

要があると考えられる。

2.2.3.4 種多様性指標と林冠構造指標の相関

2016 年の 20 m メッシュにおける種多様性指標 S (種数) は 21-65 と空間的に異質性がみられた (図 28)。また、DCHM の値から算出した林冠構造指標 (対数変換、最小-最大) については、MIN は 0.57-3.67、MAX は、3.41-4.08、MEAN は 2.51-3.98、RANGE は 2.87-3.94、STD は 0.87-2.86、SUM は 12.42-13.49、Tor は 1.58-7.40 の値をとり、それぞれ空間的な異質性がみられた (図 29)。

また、これらの樹木の種多様性指標と林冠構造指標の相関について、Intrinsic CAR モデルをバイズ統計で解析した結果、10 m メッシュでの解析では有意な相関は見られなかったのに対して、20 m メッシュでは、種多様性指標のうち Invsimp、S で有意な正の相関がみられた (図 30)。またこの時、相関がみられなかった林冠構造指標は、Invsimp における Tor (3D/2D 比) のみであった。さらに、説明力の高いモデルを DIC の値によってモデル選択した結果、10 m メッシュでのモデルでは、DIC 値はすべてヌルモデルの値より高く説明力が弱い一方で、20 m メッシュのモデルにおいては、種多様性指標のうち Invsimp、S のモデルでヌルモデルの値より低く、説明力があるモデルがあった (図 31)。説明力のあった林冠構造指標は、Invsimp で、最大樹高、平均樹高、林冠高の合計であり、最良モデルは林冠高の合計であった。また S では、最大樹高、平均樹高、樹高範囲、林冠高の合計であり、最良モデルは最大樹高であった。

Invsimp は、種数が多いかつ種間の個体数の頻度が均等であるほど高い指標である。本研究の結果は、アバンダント種とレア種のバランスを調和した状態の種多様性の高さは、林冠高の全体的な高さがカギとなっていることを示している。林冠高が全体として高いと、林冠下の空間も大きくする。このような森林環境の資源の多さがそもそもの個体数増加につながり多種共存につながっている可能性がある。一方、S は個体数の頻度を考慮せず、低頻度種により重きを置く指標である。統計の結果からは、林冠高の最大や林冠高の高低差などがレア種の存在に重要であることが示された。林冠高の最大や林冠高の高低差は、垂直方向の環境の変異の大きさを示しており、このような環境の異質性が、頻度の

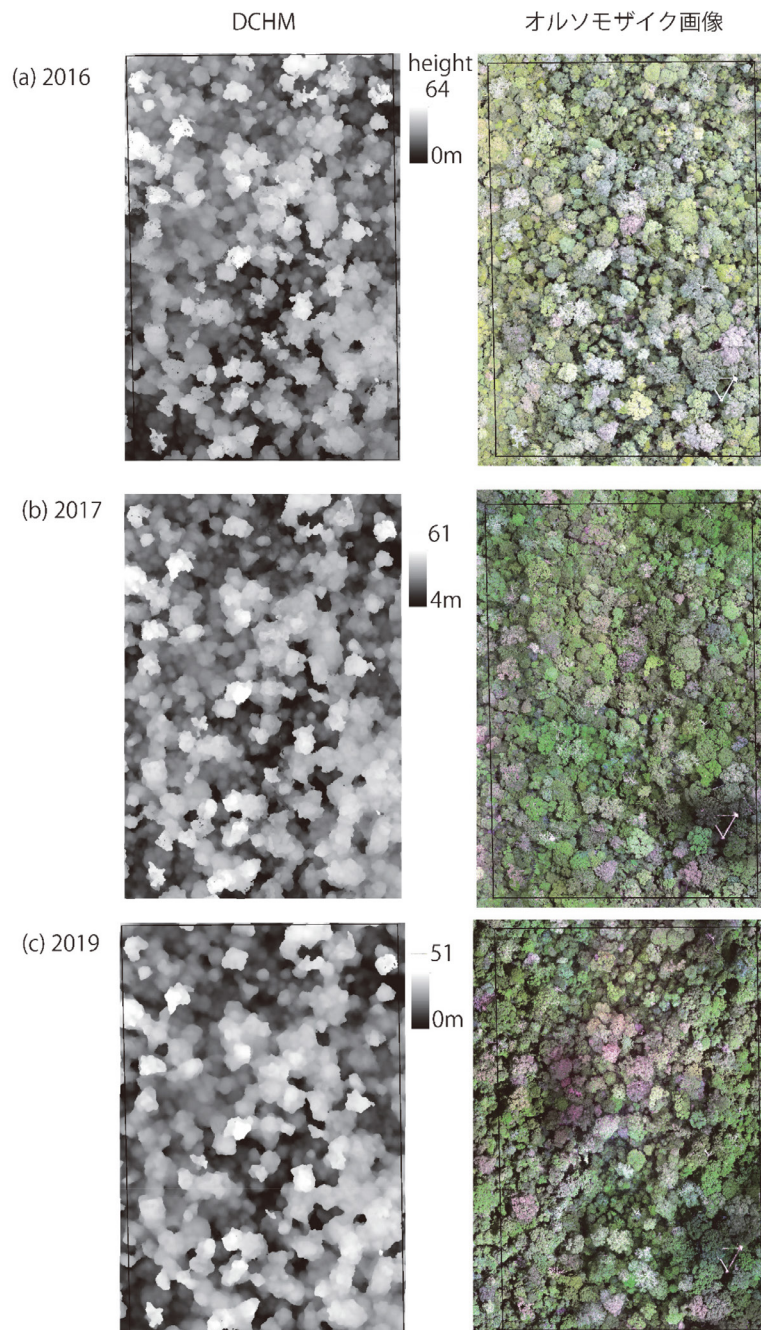


図 26 各年における DCHM (左) とオルソモザイク画像 (右)。

表 11 年度別 6ha 内の DCHM の最大樹高、平均林冠高と標準偏差 (SD)、ギャップ率

	最大樹高 (m)	平均林冠高 (m)	SD	ギャップ (%)	
				10m以下	20m以下
2016	64.8	33.3	11.6	2.3	11.1
2017	61.3	34.2	11	0.9	9.9
2019	51.9	28.1	10.4	3	23.7

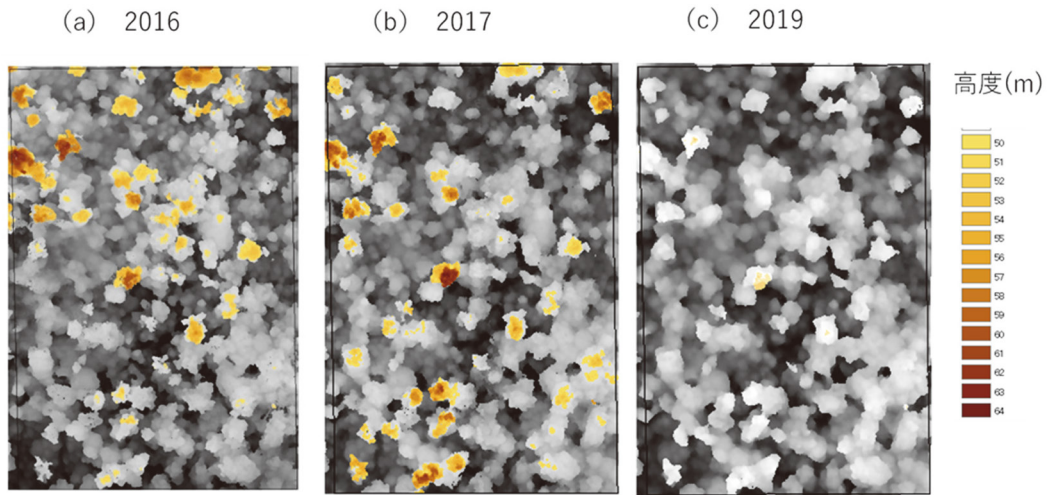


図 27 各年における DCHM。黒いほど高度が低いことを表す。カラーは、高度 50 m 以上を示す。

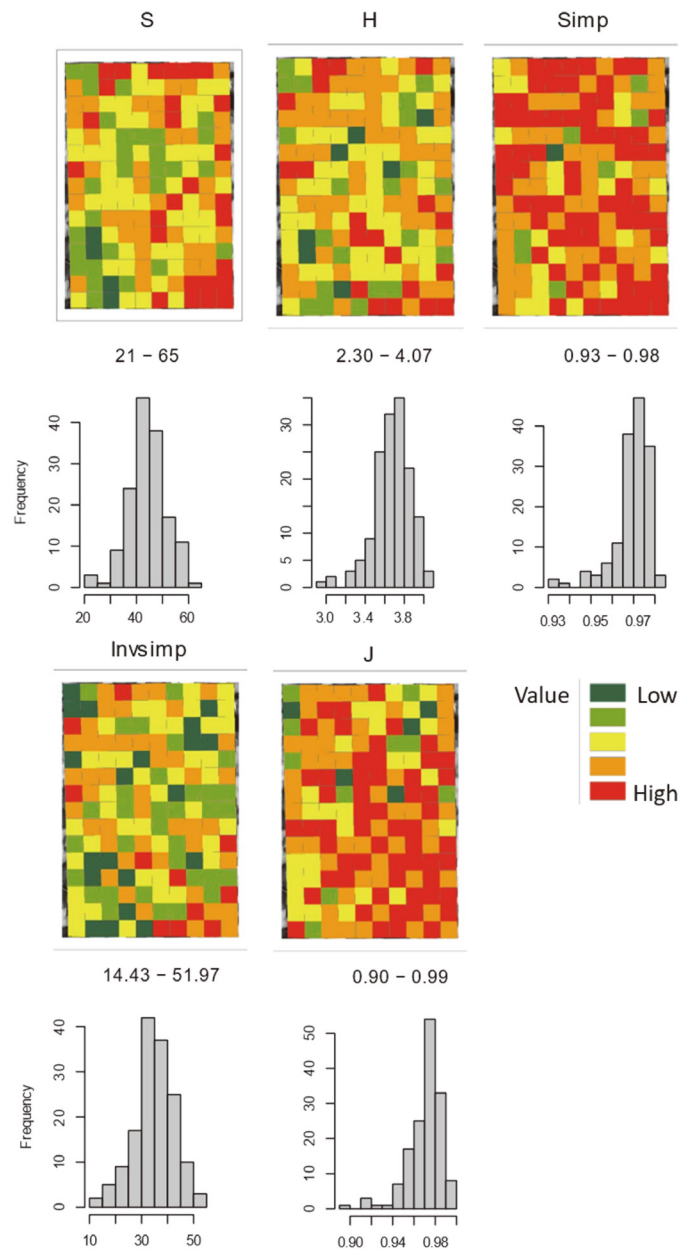


図 28 各種多様性指標の 6 ha 試験地内の空間分布 (20 m メッシュ、上) と頻度分布 (下)。

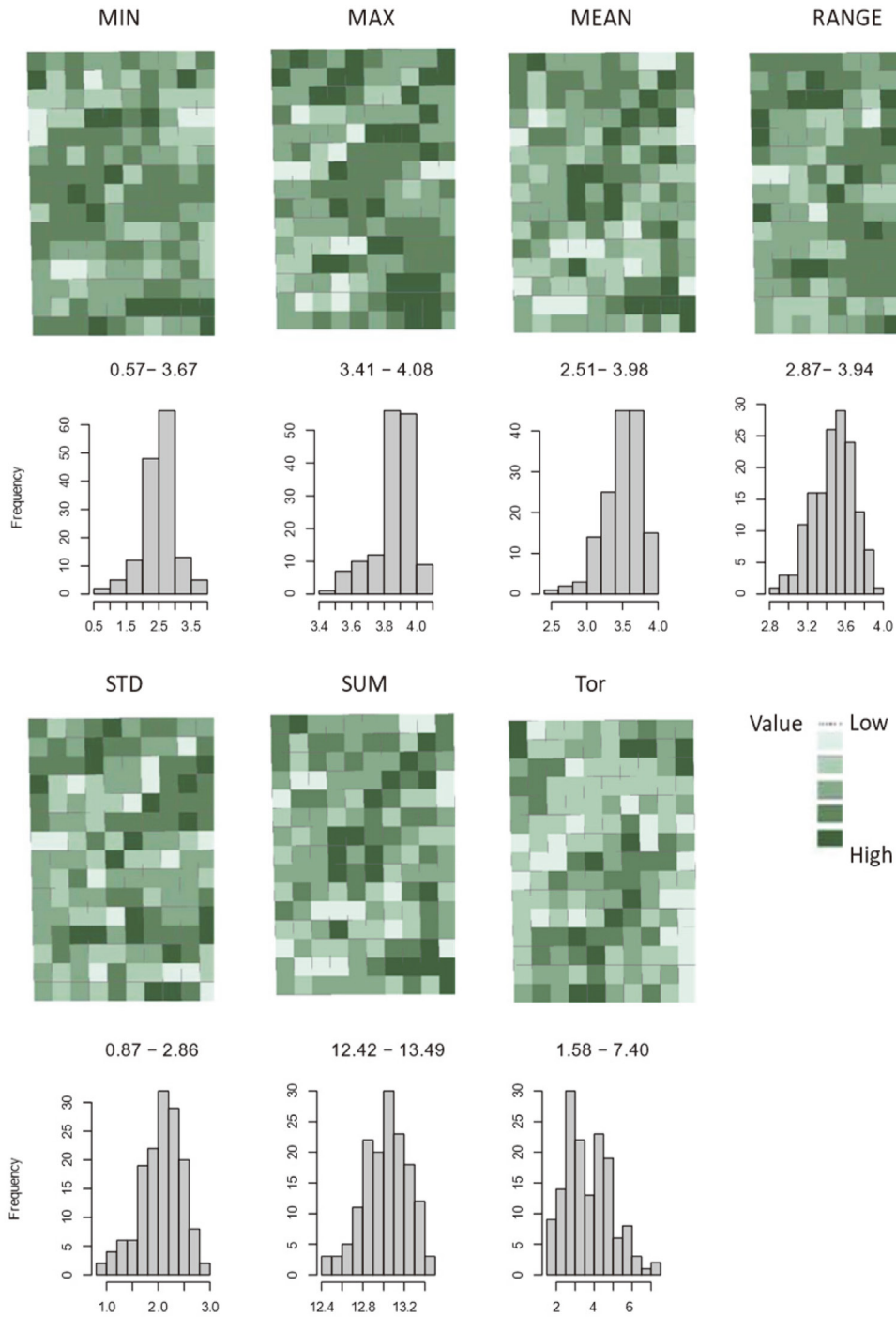


図 29 林冠構造指標の 6ha 試験地内の空間分布 (20 m メッシュ、上) と頻度分布 (下)。

低いレア種との共存をもたらしている可能性がある。

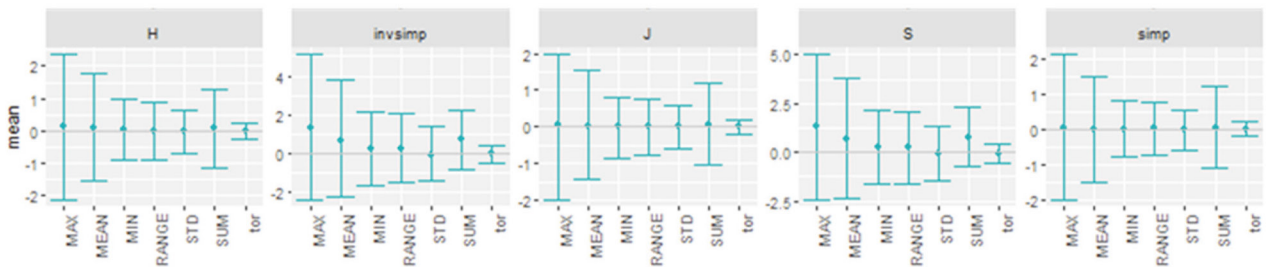
また、解析のメッシュサイズは 10 m では説明力がなかったが 20 m では有意な相関と有効なモデルがみられた。パン森林保護区における大径木の林冠サイズは 10 m 四方を超えることがあり、この場合は 1 種 1 個体が最も高い階層空間を独占することになる。このような場合は、種多様性維持のメカニズムが異なる可能性があり、空間スケールによっては効果が見えない可能性がある。この結果から、空間スケール性に考慮した解析が重要であることが示唆された。

2.2.4 サブテーマ 2 のまとめ

(1) UAV の有効性：本研究では、UAV と SfM による林冠構造の解析の有効性を確認した。UAV における観測は、低コストの運用と、高解像度のデータの取得が可能であることが最も大きなメリットである。従来の熱帯林の光学セン

(a) 10m メッシュ

- 95% CI 0を含まない
- 95% CI 0を含む



(b) 20m メッシュ

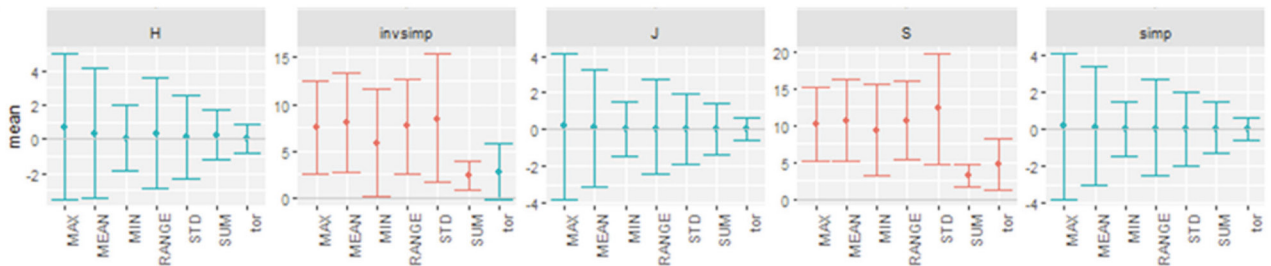
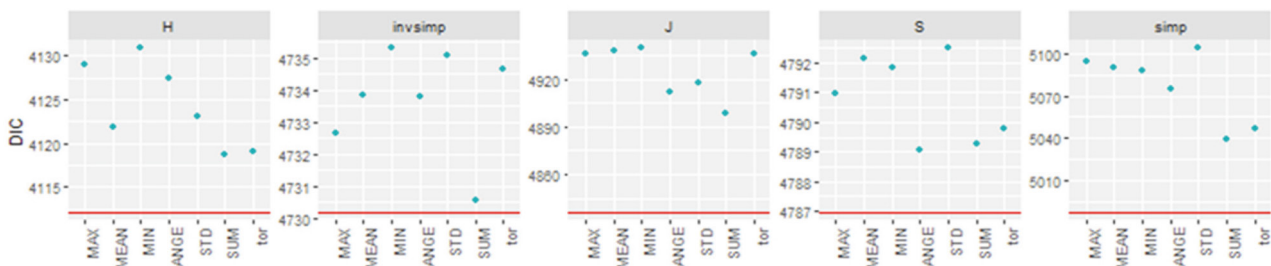


図 30 係数 (b0) の事後分布。

(a) 10m メッシュ

- 係数正の相関あり
- 相関なし



(b) 20m メッシュ

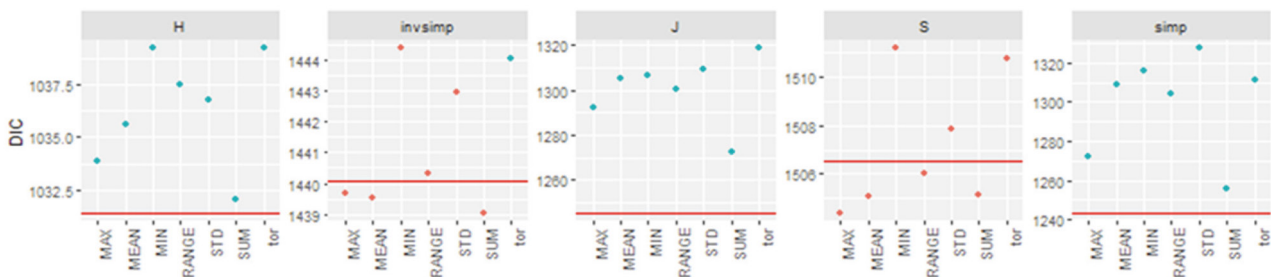


図 31 DIC 値によるモデル選択。赤線は、ヌルモデルの DIC 値であり、この値より低いモデルは説明力があるとみなした。

サーによる観測においては、人工衛星観測では雲による可視範囲の制約があること、有人航空機による観測は高額であることから、データの取得が困難であったが、UAV の活用はこれらの問題を解決するブレイクスルーとなる。森林における UAV を用いた観測は既に増加の傾向にあり、林冠高の観測⁶⁾、フェノロジーの観測⁷⁾ など、事例やノウハウが蓄積しつつある。また、野生動物の個体数の観測⁸⁾、密猟の監視⁹⁾ など、生物多様性の研究の応用面でも活用されている。今後、UAV や搭載するセンサー (例えば LiDAR) の小型化・低コスト化が実現されれば、正確な地形デー

タを得ることや、垂直方向における精度評価についても多点で同時に行うことができるため、より詳細な森林構造の解析が期待できるだろう。

(2) 種多様性における林冠構造の重要性：本研究での結果より、当初の予想の通り種多様性と林冠高の高さに正の相関があることが示され、種多様性維持における林冠構造の重要性が示唆された。また、この現象はスケール依存性があることもわかり、種多様性維持機構のメカニズムを考える上では空間スケールを考慮する必要があると考えられた。これまでの研究において、温帯林において鳥類や節足動物の種多様性と林冠構造の関係性については研究が進んでいる¹⁰⁾。一方で、樹木の多様性における林冠構造との関係性を解析した研究についてははまだ例が限られている。パソ森林保護区においては、航空機 LiDAR で林冠高を観測し種多様性との相関を解析した研究事例があるが、これらの相関はみられなかった¹¹⁾。本研究において相関が見られた理由としては、従来の研究のデータよりも解像度が改善し、林冠指標の感受性が上がったこと、スケール性を考慮したこと、などが考えられる。また、林冠構造に感受性が強かった種多様性指標が *Invsimp*、*S* であったことも興味深い。指標によって、群集の中の頻度やレア種への感度の高さが異なることから、種多様性を維持するメカニズムのヒントが得られるかもしれない。

今後の課題として、種多様性と林冠指標の相関関係が、森林タイプや地域を超えて広くみられる現象であることを検証することがあげられる。このことが明らかになれば、解像度のよい人工衛星リモートセンシングと組み合わせることによって、林冠構造を広域スケールで観測し、種多様性と相関のある林冠指標を代替することで生物多様性の広域観測が実現する可能性がある。そのためには、森林構造と生物多様性の関係を生むメカニズムの理論的検討も行うことも必要となるだろう。

引用文献

- 1) MacArthur, R.H. & Wilson, E.O. (1960). *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton.
- 2) Kohyama T. (1993). Size-structured tree populations in gap-dynamic forest: the forest architecture hypothesis for the stable coexistence of species. *Journal of Ecology*, 81(1), 131-143. doi: 10.2307/2261230.
- 3) Kohyama, T., Suzuki, E., Partomihardjo, T., Yamada, T. & Kubo, T. (2003). Tree species differentiation in growth, recruitment and allometry in relation to maximum height in a Bornean mixed dipterocarp forest. *Journal of Ecology*, 91, 797-806.
- 4) Nex, F. & Remondino, F. (2014). UAV for 3D mapping applications: A review.
- 5) Harlley, A. & Zisserman, A. (2006). *Multiple view geometry in computer vision* (2. ed.).
- 6) Wallace, L., Lucieer, A., Malenovsky, Z., Turner, D. & Vopěnka, P. (2016). Assessment of Forest Structure Using Two UAV Techniques: A Comparison of Airborne Laser Scanning and Structure from Motion (SfM) Point Clouds.
- 7) 古家 直 & 倉本 恵 (2018). UAV を用いた着花および結実のモニタリングの可能性. *北海道の林木育種*, 61, 6-10.
- 8) Koh, L.P. & Wich, S.A. (2012). Dawn of Drone Ecology: Low-Cost Autonomous Aerial Vehicles for Conservation. *Tropical Conservation Science*, 5, 121-132.
- 9) Schiffman, R. (2014). Drones Flying High as New Tool for Field Biologists. *Science*, 344, 459-459.
- 10) Davies, A.B. & Asner, G.P. (2014). Advances in animal ecology from 3D-LiDAR ecosystem mapping. *Trends in Ecology & Evolution*, 29, 681-691.
- 11) Okuda, T., Nor Azman, H., Manokaran, N., Saw, L.Q., Amir, H.M.S. & Ashton, P.S. (2004). Local variation of canopy structure in relation to soils and topography and the implications for species diversity in a rain forest of Peninsular Malaysia. In: Losos, E.C. & Leigh Jr., E.G. (eds). *Tropical Forest Diversity and Dynamism: Findings from a Large-Scale Plot Network*, pp. 221-239.

2.3 サブテーマ3 メタバーコーディング技術を応用した陸上動物の多様性評価手法の開発

2.3.1 目的と経緯

熱帯林に分布する野生動物の特徴として、活動パターンが時間的・空間的に特殊化している種が多いことが挙げられる。そのため、少数の研究者が現地へ赴いて種構成全体を把握することは非常に困難である。2015年に海水に含まれるDNAを解析し、そこに生息する魚の種類を判定する方法が報告された¹⁾。この技術を熱帯林内で採取した雨水や河川水に応用し、その有効性を評価・検討する。熱帯林内で採取したこれらの水には、分布する動物の糞、尿、皮膚組織等が含まれている可能性があるため、それらの水から分布している動物のDNAが検出できる可能性がある。同時にすでに有効性が証明されている、野外用カメラによる自動撮影も並行して行い、今回の手法の有効性を評価する基準データを収集する。今回の手法が成功すれば河川水や雨を採取するだけで、熱帯林に分布する野生動物の種多様性を評価することが可能になり、野生動物の分布情報収集が大幅に省力化される。その結果、予算や人員に制約の多い、熱帯林でも野生動物の種多様性評価を広範囲で実施することが可能になる。

2.3.2 方法

2.3.2.1 野外用カメラを利用した野生動物分布調査

環境DNAによる検出結果の有効性を検証する基礎データを得るため、野外用カメラ(Bushnell TROPHYCAM (Model 119636))によりパソ森林保護区内に分布する野生動物の撮影を実施した(図32)。野外用カメラは保護区内に2km間隔で47基を設置した。



図32 パソ森林保護区内に設置した野外用カメラ(Bushnell TROPHYCAM (Model 119636)) (左)。設置する際には防塵・防水性を高めるために外側を金属製のカバーで覆った(右)。

2.3.2.2 飼育施設を利用した予備実験(雨水による動物種の判別)

雨水から抽出したDNA中に動物由来のDNAが含まれている可能性があるのかを検証するため、飼育施設を利用した予備実験を行った。この予備実験には、沖縄こどもの国の協力を得た。

クビワオオコウモリ(*Pteropus dasymallus*)の亜種であるオリイオオコウモリ(*Pteropus dasymallus inopinatus*)が飼育されているケージ内にアルミ製容器を設置し、雨水の採取を行った。採取した雨水はDNA抽出まで -30°C に冷凍保存した(図33)。

冷凍保存した雨水を国立環境研究所に移送後、電動式真空ポンプで採取した雨水500mlと1000mlをそれぞれ別にろ過した。ろ過にはガラス繊維ろ紙、GF/F(GEヘルスケア・ジャパン)を使用した(図34)。使用したろ紙の半分を細切し、Proteinase K solution(QIAGEN)50 μl 、BufferG2(QIAGEN)1mlと1.5mlチューブ内で混合し、 56°C で一昼



図 33 オリイオオコウモリ (*Pteropus dasymallus inopinatus*) が飼育されているケージでの予備実験の様子。

夜インキュベートした。インキュベート後、それぞれの混合液から 200 μ l ずつを分注し、試料 A-500 ml、試料 B-1000 ml とした。混合液からの DNA の抽出には、EZ1 DNA Tissue Kit (QIAGEN) を使用した。その際、最終の溶出液量は 50 μ l に設定した。

抽出した DNA を使用して、ミトコンドリア DNA・チトクローム b 遺伝子の配列の一部 (長さ約 500 bp) を PCR で増幅を試みた。PCR には、L14724 と H15149²⁾ を使用した。PCR 反応液は KOD-Plus-Ver.2 (東洋紡) を使用して調整した。その際、PCR は各試料 3 本ずつで行った。

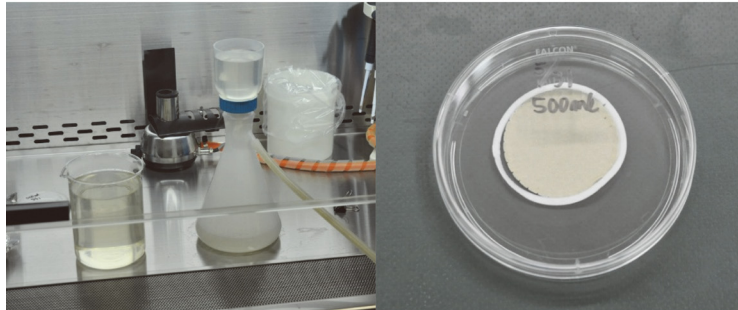


図 34 オリイオオコウモリの飼育ケージ内で採水した雨水のろ過方法。自動真空ポンプとガラス繊維ろ紙、GF/F (GE ヘルスケア・ジャパン) を使用した。

PCR 反応液の調製方法および PCR 条件は以下のとおりである。

PCR 反応液の調製方法		CR 条件		
DW	30.4 μ l	94 $^{\circ}$ C	2 分	
10xPCR Buffer	5.0 μ l	↓		
2mM dNTP	5.0 μ l	94 $^{\circ}$ C	30 秒	
25mM MgSO4	3.0 μ l	50 $^{\circ}$ C	30 秒	35 回
L14724 50 μ M	0.3 μ l	68 $^{\circ}$ C	1 分	
H15149 50 μ M	0.3 μ l	↓		
KOD plus Ver.2	1.0 μ l	4 $^{\circ}$ C	∞	
ろ紙より抽出した DNA	5.0 μ l			
計	50.0 μ l			

PCR 終了後、2% アガロースゲルを使用した電気泳動と DNA の染色を行った。PCR 産物の増幅が確認できた場合は、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(ライフテクノロジーズ社)と Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer(ライフテクノロジーズ社)を使用したダイレクトシーケンス法によって増幅した PCR 産物の塩基配列決定を試みた。得られた配列の確認には BioEdit³⁾ を、相同性解析には The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> を利用した。

2.3.2.3 パン森林保護区における環境 DNA を活用した動物種の判別

カメラを設置した同一地点にプラスチック容器を 10 日間埋設し、雨水等を採取した(図 35)。採水は 9ヶ所で実施した(地点番号:101、102、111、109、110、302、316、318、327)。採取した雨水等は DNA 抽出まで家庭用冷凍冷蔵庫で冷凍保存した。

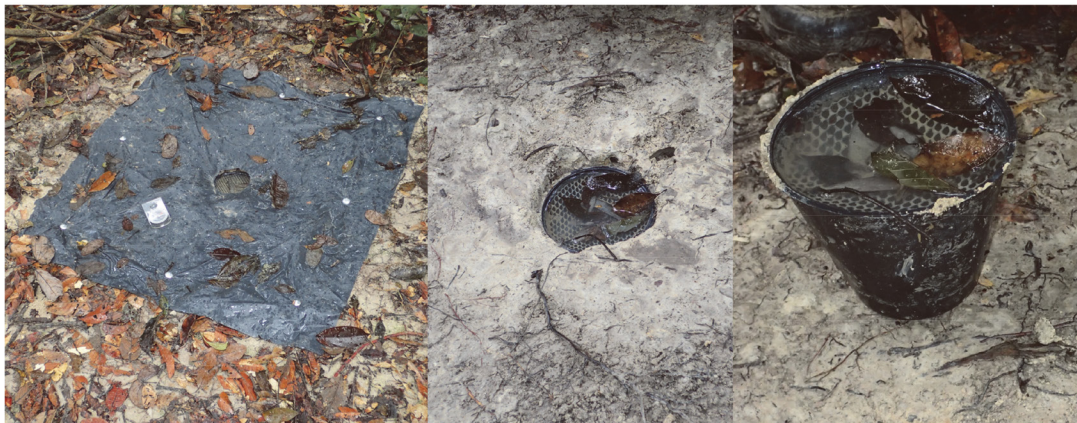


図 35 パン森林保護区における採水方法。地面に容器を 10 日間埋設した。

次に手動式真空ポンプで採取した雨水等(500 ml)のろ過作業を実施した。ろ過にはガラス繊維ろ紙、GF/D (GE ヘルスケア・ジャパン)を使用した(図 36)。使用したろ紙の半分を細切し、Proteinase K solution (QIAGEN) 120 ml、Buffer ATL (QIAGEN) 1080 ml と 1.5 ml チューブ内で混合し、56℃で一昼夜インキュベートした。インキュベート後、それぞれの混合液から 400 µl ずつを分注し、試料 101、試料 102、試料 111、試料 109、試料 110、試料 302、試料 316、試料 318、試料 327 とした。インキュベート後の混合液からの DNA の抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使用した。その際、最終の溶出液量は 100µl に設定した。

抽出された DNA を使用して、ミトコンドリア DNA・チトクローム b 遺伝子の配列の一部(長さ約 400 bp)の増幅を試みた。増幅する際には Nested PCR 法を適用した。1 回目の PCR には、L14724 と H15149 を使用した。PCR 反応液は KOD FX (東洋紡) を使用して調整した。また、2 回目の PCR には L14841 と H15149⁴⁾ に次世代シーケンサー用のアダプター配列を結合したプライマー、L14841NGS と H15149NGS を使用した(表 12)。PCR 反応液は Q5 High-Fidelity 2X Master mix (New England Biolabs) で調整した。



図 36 パン森林保護区における雨水等のろ過の様子。手動式真空ポンプとガラス繊維ろ紙、GF/D (GE ヘルスケア・ジャパン) を使用した

表 12 種判別用プライマーの配列

L14724	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG
L14841	AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA
H15149	AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA
L14841NGS	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA
H15149NGS	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA

PCR 反応液の調製方法および PCR 条件は以下のとおりである。

第 1 回目の PCR 反応液調製方法		第 1 回目の PCR 条件	
DW	6.0 µl	94 °C	2 分
2xPCR Buffer	25.0 µl	↓	
2mM dNTP	10.0 µl	98 °C	10 秒
L14724 10µM	1.5 µl	0 °C	30 秒 35 回
H15149 10µM	1.5 µl	68 °C	1 分
KOD FX	1.0 µl	↓	
ろ紙より抽出した DNA	5.0 µl	4 °C	∞
計	50.0 µl		

第 2 回目の PCR 反応液の調製方法		第 2 回目の PCR 条件	
DW	19.0 µl	98 °C	30 秒
Q5 High-Fidelity 2X Master mix	25.0 µl	↓	
L14841NGS 10µM	2.5 µl	98 °C	10 秒
H15149NGS 10µM	2.5 µl	60 °C	30 秒 35 回
1 回目の PCR 反応液	1.0 µl	72 °C	1 分
計	50.0 µl	↓	
		72 °C	2 分
		↓	
		4 °C	∞

2 回目の PCR 終了後、2% アガロースゲルを使用した電気泳動と DNA の染色を行った。PCR 産物の増幅が確認できた場合は、QIAquick PCR Purification Kit を使用して PCR 産物の精製を行った。精製した PCR 産物でシーケンス用ライブラリーを調整した。ライブラリーの調整は、16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (illumina) の一部を変更して行い、シーケンスには MiSeq システム (illumina) を利用した。得られた配列の由来 (動物種) を解析には、Genomic Workbench ver11.02 (QIAGEN) を使用した。その際、野外用カメラで撮影されて動物種のミトコンドリア DNA・チトクローム b 配列についてデータベースを構築し、そのデータベースを種判別用参照データとした。

2.3.3 結果と考察

2.3.3.1 バン森林保護区に分布する野生動物種の把握

野外用カメラによる撮影は 26 か月間 (2016 年 4 月～2018 年 5 月) 実施した。画像データの回収は、6～7 ヶ月間隔で実施した。この期間中に撮影された画像は 119,383 枚であった。また、合計のカメラ稼働日数は 21,822 日であった (表 13)。

撮影された画像を解析した結果、哺乳類 38 種 (ヒトを含む。また、種不明 2 種)、鳥類 18 種および爬虫類 2 種、合

表 13 野外用カメラ稼働状況のまとめ。

撮影期間	期間中の稼働カメラ数	カメラ稼働合計日数	合計撮影枚数	期間中に撮影された動物種数
2016年4月～2016年10月	44	6589	32598	44
2016年11月～2017年3月	42	4573	28696	42
2017年3月～2017年9月	36	4154	24994	40
2017年10月～2018年1月	21	3540	21726	37
2018年1月～2018年5月	29	2966	11369	35
合計		21822	119383	

計 58 種（ヒトを含む。また、種不明 2 種）を確認した。イノシシ (*Sus scrofa*) の撮影頻度が最も高く（図 37）、その他にミナミブタオザル (*Macaca nemestrina*)、ネズミ目の小型哺乳類、およびマレーバク (*Tapirus indicus*) の撮影頻度が高かった（図 38）。

IUCN のレッドリストを基準に撮影された動物種を分類したところ、パソ森林保護区に絶滅危惧種が 12 種（CR:2 種、



図 37 撮影頻度が最も高かったイノシシ。

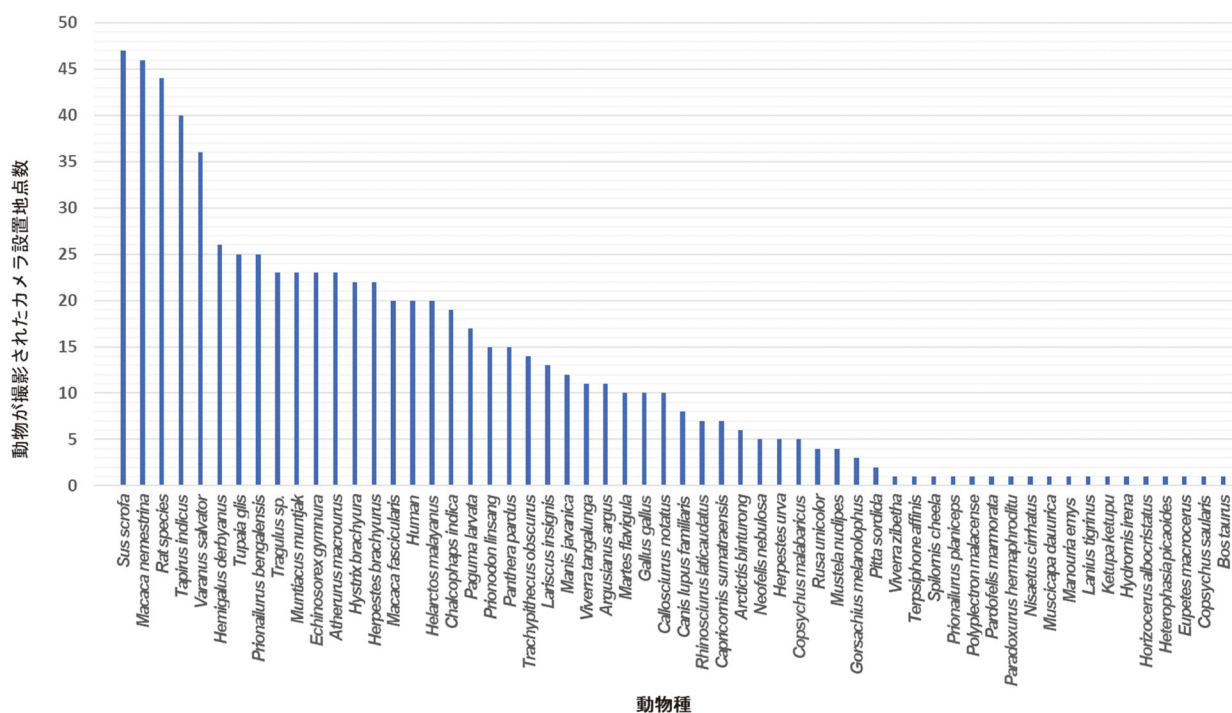


図 38 パソ森林保護区で撮影された動物種とその撮影地点数。

EN：2種、VU：8種）分布していることを確認した（表14）。具体的な種名は以下のとおりである（図39）。

マレーセンザンコウ (*Manis javanica*(CR))、エミスムツアシガメ (*Manouria emys*(CR))、マレーヤマネコ (*Prionailurus planiceps* (EN))、マレーバク (EN)、ビントロング (*Arctictis binturong* (VU))、スマトラカモシカ (*Capricornis sumatraensis* (VU))、マレーグマ (*Helarctos malayanus* (VU))、ミナミブタオザル (VU)、ウンピョウ (*Neofelis nebulosa* (VU))、ヒョウ (*Panthera pardus* (VU))、エボシコクジャク (*Polyplectron malacense* (VU))、スイロク (*Rusa unicolor* (VU))。

表14 パソ森林保護区内で撮影された絶滅危惧種数

	絶滅危惧種			NT	LC	その他	合計
	CR	EN	VU				
哺乳類	1	2	7	5	18	6	39
鳥類			1	3	14		18
爬虫類	1						1



図39 パソ森林保護区で確認された絶滅危惧種。A：マレーセンザンコウ (*Manis javanica* (CR))、B：エミスムツアシガメ (*Manouria emys* (CR))、C：マレーヤマネコ (*Prionailurus planiceps* (EN))、D：マレーバク (EN)、E：ビントロング (*Arctictis binturong* (VU))、F：スマトラカモシカ (*Capricornis sumatraensis* (VU))

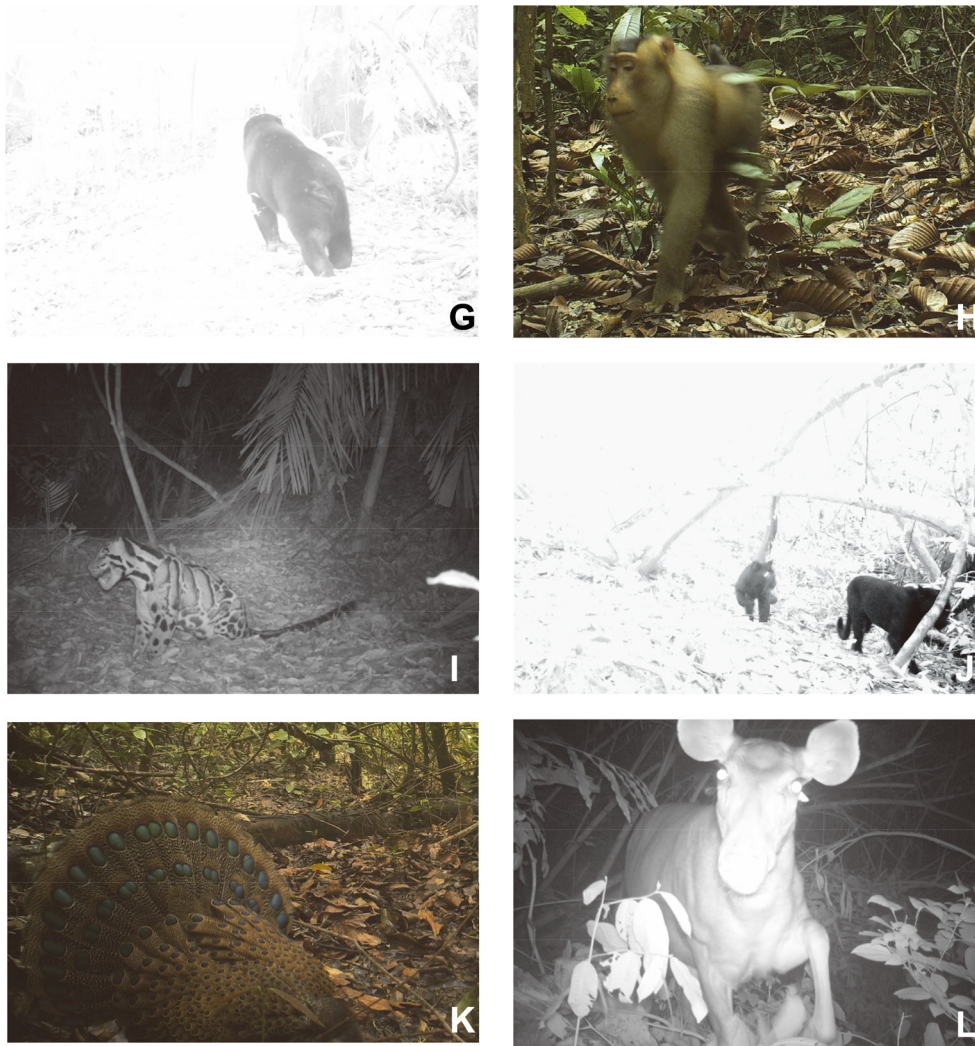


図 39 パン森林保護区で確認された絶滅危惧種 (続き)。G：マレーグマ (*Helarctos malayanus* (VU))、H：ミナミブタオザル (VU)、I：ウンピョウ (*Neofelis nebulosa* (VU))、J：ヒョウ (*Panthera pardus* (VU))、K：エボシコクジャク (*Polyplectron malacense* (VU))、L：スイロク (*Rusa unicolor* (VU))

撮影された動物種 (哺乳類 38 種 (内種不明 2 種)、鳥類 18 種および爬虫類 2 種) のデータをもとに、ミトコンドリア DNA・チトクローム b 配列についてデータベースを構築した。このデータベースを種判別用参照データとした。その際、*Eupetes macrocerus*、*Hydrornis irena*、*Hystrix brachyura*、*Muscicapa dauurica*、*Rhinosciurus laticaudatus*、*Terpsiphone affinis*、以上 6 種についてはミトコンドリア DNA・チトクローム b 配列が登録されていない、あるいは登録されている配列情報が短かったため種判別用参照データからは除外した。データベースを構築した際に使用した配列のアクセッション番号は以下のとおりである (表 15)。

2.3.3.2 飼育施設を利用した予備実験

試料 A-500ml、B-1000ml から抽出された DNA 濃度を NanoDrop (SCRUM 社) で測定したところ、それぞれ、3.5 ng/μl、30.4 ng/μl であった。これらの DNA 抽出液 5 μl をテンプレートに PCR を実施したところ、試料 A-500ml および試料 B-1000ml の各 3 本全チューブで PCR 産物の増幅を確認した (図 40)。

試料 A-500ml から得られた PCR 産物の塩基配列を確認したところ、3 本から得られた配列 (424 bp) は塩基配列が共通であることが分かった。また、相同性解析を実施したところ、クビワオオコウモリに由来する配列 (アクセッション番号：AB042770.1) と完全に一致した (図 41)。

表 15 種判別用データベースを構築する際に対象とした動物種と該当するアクセス番号

学名	アクセス番号
<i>Arctictis binturong</i>	KM819539.1
<i>Argusianus argus</i>	AF013761.1
<i>Atherurus macrourus</i>	FJ931121.1
<i>Callosciurus notatus</i>	AB499913.1
<i>Capricornis sumatrensis</i>	DQ459334.1
<i>Chalcophaps indica</i>	KJ456225.1
<i>Copsychus malabaricus</i>	FJ487859.1
<i>Copsychus saularis</i>	FJ487811.1
<i>Echinosorex gymnura</i>	NC_002808.1
<i>Gorsachius melanolophus</i>	KT364531.1
<i>Helarctos malayanus</i>	U18899.1
<i>Hemigalus derbyanus</i>	AY170109.1
<i>Herpestes brachyurus</i>	KJ438339.1
<i>Herpestes urva</i>	DQ519074.1
<i>Heterophasia picaoides</i>	KJ456301.1
<i>Tropicranus albocristatus</i>	GU257921.1
<i>Bubo ketupu</i>	EU348974.1
<i>Lanius tigrinus</i>	MF458376.1
<i>Lariscus insignis</i>	AB499904.1
<i>Manis javanica</i>	MG196309.1
<i>Manouria emys</i>	NC_007693.
<i>Martes flavigula</i>	EF987749.1
<i>Muntiacus muntjak</i>	AF042717.1
<i>Mustela nudipes</i>	EF987745.1
<i>Neofelis nebulosa</i>	DQ257669.1
<i>Spizaetus cirrhatus</i>	AJ604506.2
<i>Paguma larvata</i>	AB511057.1
<i>Panthera pardus</i>	MG932393.1
<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>	FJ881693.1
<i>Pardofelis marmorata</i>	KT288227.2
<i>Pitta sordida</i>	KJ456408.1
<i>Polyplectron malacense</i>	AF330065.1
<i>Prionailurus bengalensis</i>	KR297199.1
<i>Prionailurus planiceps</i>	KR297161.1
<i>Prionodon linsang</i>	AF125141.2
<i>Rusa unicolor</i>	MF177030.1
<i>Spilornis cheela</i>	JN191388.1

表 15 続き

学名	アクセッション番号
<i>Tapirus indicus</i>	JX014351.1
<i>Trachypithecus obscurus</i>	MF872234.1
<i>Tragulus napu</i>	AB122112.1
<i>Tragulus javanicus</i>	AB122110.1
<i>Tragulus kanchil</i>	JN632709.1
<i>Tupaia glis</i>	AY321644.1
<i>Varanus salvator</i>	AB980995.1
<i>Viverra zibetha</i>	AF511045.1
<i>Viverra zibetha</i>	AF511047.1
<i>Bos taurus</i>	MH714784.1
<i>Gallus gallus</i>	EU839454.1
<i>Canis lupus</i>	KJ660982.1
<i>Homo sapiens</i>	AY243935.1
<i>Sus scrofa</i>	AB015083.1
<i>Macaca fascicularis</i>	FJ906803.1
<i>Macaca nemestrina</i>	HM071136.1
<i>Trachypithecus obscurus</i>	AY863425.1

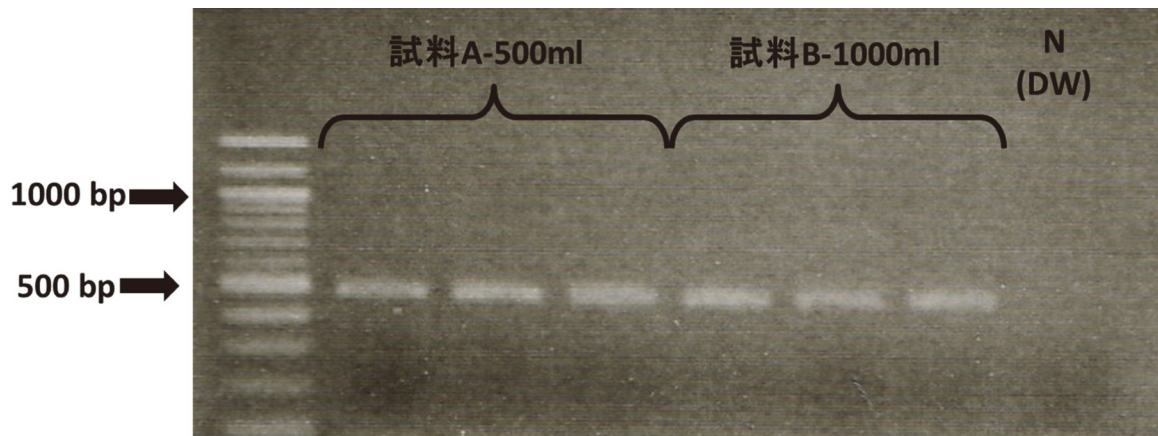


図 40 飼育施設で採取した雨水に由来する DNA をテンプレートにした PCR の結果。試料 A-500 ml の PCR 産物を対象にシーケンスを行った。

今回の結果から、雨水 500 ml から DNA を抽出することによって、ケージ内の動物の塩基配列を検出することが可能であることが分かった。これは、雨水に、ケージ内の動物の糞、尿、皮膚組織の一部等が混入するためだと考えられる。また、野外においても同一の方法で、雨水から周辺に生息する野生動物の塩基配列を検出することが可能であることが示唆された。

2.3.3.3 パン森林保護区内で得られた環境 DNA を活用した動物種の判別

試料 101、試料 102、試料 109、試料 110、試料 111、試料 302、試料 316、試料 318、試料 327 から抽出された DNA

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Sample(500ml rain)
AB042770.1:14160-14583
TATTTCAACTACAAGAACCCGCAATGACAAACATCCGAAAATCACACCCATTATTTCAAAATTTATCAACGACTCCTAATCGACCTACCCGCCCATCAAAAT
TATTTCAACTACAAGAACCCGCAATGACAAACATCCGAAAATCACACCCATTATTTCAAAATTTATCAACGACTCCTAATCGACCTACCCGCCCATCAAAAT

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Sample(500ml rain)
AB042770.1:14160-14583
ATCTTTCATGATGAAACTTCGGCTCACTACTAGGCATCTGCCTAGCCATTCAAATCTTAACAGGACTATTCTGGCCATACACTACACTTCAGACACAA
ATCTTTCATGATGAAACTTCGGCTCACTACTAGGCATCTGCCTAGCCATTCAAATCTTAACAGGACTATTCTGGCCATACACTACACTTCAGACACAA

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Sample(500ml rain)
AB042770.1:14160-14583
CAACCGCCTTCCAATCCGTAAACCCACATCTGCCGAGACGTAACCTACGGCTGAATCCTACGCTATTACATGCCAACGGAGCATCCATATTTTTCATCTG
CAACCGCCTTCCAATCCGTAAACCCACATCTGCCGAGACGTAACCTACGGCTGAATCCTACGCTATTACATGCCAACGGAGCATCCATATTTTTCATCTG

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Sample(500ml rain)
AB042770.1:14160-14583
TCTGTTCTACACGTAGGCCGAGGCCTGTATTACGGATCTTATATGTATAAGGAGACCTGAAACGTAGGTGTTATCCTCCTATTTGCTGTAATAGCAACA
TCTGTTCTACACGTAGGCCGAGGCCTGTATTACGGATCTTATATGTATAAGGAGACCTGAAACGTAGGTGTTATCCTCCTATTTGCTGTAATAGCAACA

      410     420
Sample(500ml rain)
AB042770.1:14160-14583
GCCTTCATAGGATATGTTCTCCCA
GCCTTCATAGGATATGTTCTCCCA

```

図 41 飼育施設で採取した雨水から得られた配列の相同解析結果。配列は、クビワオオコウモリに由来する配列（アクセッション番号：AB042770.1）と完全に一致した。

濃度を NanoDrop (SCRUM 社) で測定したところ、それぞれ、10.7 ng/μl、23.6 ng/μl、9.9 ng/μl、3.8 ng/μl、15.2 ng/μl、74.0 ng/μl、60.1 ng/μl、8.0 ng/μl、13.7 ng/μl であった。これらの DNA 抽出液 5 μl をテンプレートに PCR を実施したところ、9 サンプル中 8 サンプル（試料 102、試料 109、試料 110、試料 111、試料 302、試料 316、試料 318、試料 327）で PCR 産物の増幅を確認した（図 42）。

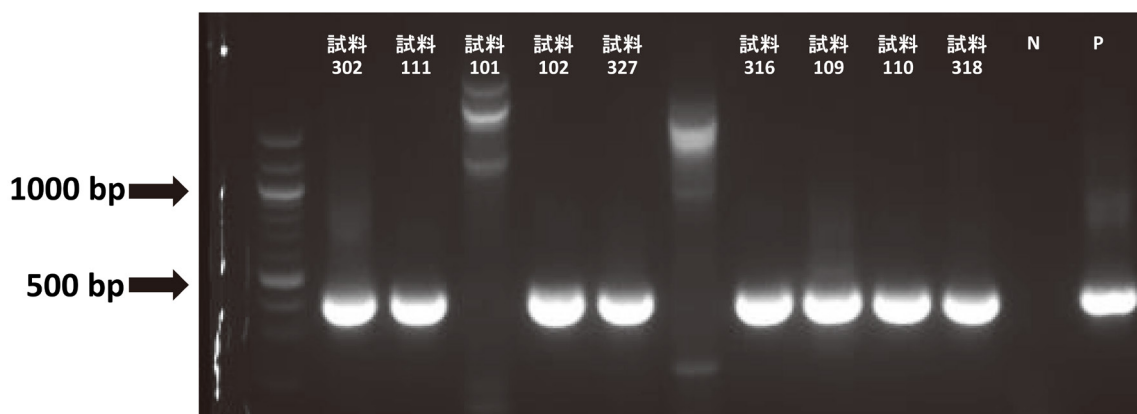


図 42 パソ森林保護区内で得られた環境 DNA をテンプレートにした PCR 結果。9 サンプル中 8 サンプルで PCR 産物の増幅を確認した。

この PCR 産物について、MiSeq システム (illumina) を利用したシーケンスを実施した。野外用カメラで撮影された動物種の配列を参照データとして、8 つの試料から得られた配列をもとに種判別を試みた。その際、同一の配列が 10 個以上あること、配列の相同性が 95% 以上であることを基準にした。その結果、得られたシーケンス配列の中に、撮影頻度が高かった、イノシシとマレーバクを含む以下の哺乳類 7 種の配列が含まれていることを確認した。

ジヌムラ (*Echinosorex gymnura*)、ベンガルヤマネコ (*Prionailurus bengalensis*)、イノシシ (*Sus scrofa*)、マレーバク (*Tapirus indicus*)、ダスキーリーフモンキー (*Trachypithecus obscurus*)、ミズオトカゲ (*Varanus salvator*)、ヒト (*Homo sapiens*) (表 16)。

今回実施した 1 回の採水では、撮影された動物種の塩基配列をすべて検出することはできなかった。しかしながら、今回は 1 回 (10 日間) のみ、9 ヲ所からの採水の結果である。カメラ撮影の場合、約 50 個のカメラを約半年間の設置することで、検出できる動物種数は 30 ~ 40 種であることを考慮すると、今回の方法で熱帯林内に分布する動物種の把握を効率化できる可能性がある。今後、採水場所を増やす、採水頻度を増やすといった採水方法を見直すことで、検出

表 16 パソ森林保護区内で得られた環境 DNA から検出された動物種。検出された種を採水地点別に示した。

採水地点番号	102	109	110	111	302	316	318	327
ジヌムラ (<i>Echinosorex gymnura</i>)					○			
ヒト (<i>Homo sapiens</i>)	○	○	○	○	○	○	○	○
ベンガルヤマネコ (<i>Prionailurus bengalensis</i>)		○		○				
イノシシ (<i>Sus scrofa</i>)		○				○	○	○
マレーバク (<i>Tapirus indicus</i>)					○			
ダスキーリーフモンキー (<i>Trachypithecus obscurus</i>)					○			
ミズオオトカゲ (<i>Varanus salvator</i>)			○				○	○

できる動物種が増えると期待される。

現段階での解析では、参照用の配列データベースは、カメラで撮影された動物種を基準に構築している。次の段階では、参照用のデータベースに一致しなかった配列について、The National Center for Biotechnology Information (NCBI) や The DNA Data Bank of Japan (DDBJ) で一般に公開されている配列と照合する作業を行う予定である。予備的な解析では、8ヶ所のサンプルから79種のDNA配列を確認し、その中には、コウモリや小型鳥類といったカメラでは撮影が困難な動物種に由来する配列も含まれていた。しかし、この動物種の中には、パソ森林保護区に分布する可能性が低い種も含まれている。今後は、配列の一致率を100%にする、検出される同一配列数を増やす等、条件を厳格化して解析を進める予定である。また、解析の精度を向上させるためには、参照用の配列データを充実させる必要がある。実際にカメラで撮影された動物種の中で、6種についてはミトコンドリアDNA・チトクロームb配列が登録されていない、あるいは登録されている配列情報が短かったため種判別用参照データからは除外している。そのため、種判別の精度を向上させるためには、ミトコンドリアDNA・チトクロームb配列やシトクロームオキシダーゼサブユニットIといったDNAバーコーディングに使用される配列の充実が必要である。

2.3.4 サブテーマ3のまとめ

- (1) パソ森林保護区全域における脊椎動物相の概要を把握することができた（哺乳類38種（ヒトを含む。また、種不明2種）、鳥類18種および爬虫類2種）。また、パソ森林保護区に絶滅危惧種が12種（CR:2種、EN:2種、VU:8種）分布していることを確認した。
- (2) カメラを設置した同一地点8ヶ所で10日間雨水等を採取し、それに含まれるDNAを解析したところ、カメラトラップで撮影された動物種58種中7種に由来するDNAを検出した。採水場所や採水頻度を増やすことで、検出できる動物種が増加する可能性がある。
- (3) 採水方法の変更、データ解析方法の改良および参照用データの充実等で、熱帯林内で採取した水を活用した野生動物の多様性評価を効率化できる可能性がある。

引用文献

- 1) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto, S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W.

- (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R Soc Open Sci.* 22; 2(7): 150088.
- 2) Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol.* 32: 128-144.
 - 3) Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
 - 4) Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 6196-6200.

[資 料]

1 研究の組織と研究課題の構成

1.1 研究の組織

[A 研究担当者]

地球環境研究センター

センター長

三枝信子

陸域モニタリング推進室

平 春* (平成 28 ~ 29 年度)

陸域モニタリング推進室

林 真智* (平成 28 年度)

炭素循環研究室

富松 元

生物・生態系環境研究センター

環境ストレス機構解明研究室

唐 艶鴻* (平成 28 年度)

生態リスク評価・対策研究室

大沼 学

生物多様性評価・予測研究室

竹内やよい

環境計測研究センター

動態化学研究室

齊藤拓也

(注) 所属・役職は年度終了時点のもの。また、*印は過去に所属していた職員等を示す。

[B 客員研究員]

唐 艶鴻 (北京大学・教授) (平成 29 ~ 30 年度)

[C 協力研究者]

佐藤 保 (森林総合研究所・領域長) (平成 28 ~ 30 年度)

新山 馨 (森林総合研究所・研究専門員) (平成 28 ~ 30 年度)

Hamdan Omar (Forest Research Institute Malaysia・Research Officer) (平成 28 ~ 30 年度)

Azharizan Mohamad Norizan (Forest Research Institute Malaysia・Research Officer) (平成 28 ~ 30 年度)

奥田敏統 (広島大学・教授) (平成 28 ~ 30 年度)

1.2 研究課題と担当者

サブテーマ 1 生物起源揮発性有機化合物を含む植物生理機能の多様性評価手法の開発

齊藤拓也、富松 元

サブテーマ 2 低高度リモセン技術を用いた林冠 3D 構造の復元手法と生物多様性指標の開発

竹内やよい、三枝信子

サブテーマ 3 メタバーコーディング技術を応用した陸上動物の多様性評価手法の開発

大沼 学

2 研究成果発表一覧

2.1 口頭発表

発表者・(暦年)・題目・学会等名称・予稿集名・頁

Takeuchi Y., Pingchun, Saigusa N., Hayashi M., Niiyama K., Sato T., Okuda T. , Omar H. , Norizan A. M. (2017) Forest canopy structure analyzed by UAV-SfM: toward understanding the relationship between forest structure and species diversity. The 12th International Congress of Ecology.

KANG Huixing, TOMIMATSU Hajime, SAITO Takuya, ZHU Ting, MA Yixin, WANG Xiruo, TANG Yanhong 2017 Fast photosynthetic induction response in shade intolerant species in a Malaysia tropical rain forest, 光合成機能の環境応答とモデリングワークショップ

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第 135 号
NIES Research Project Report, No.135

(SR - 135 - 2019)

東南アジア熱帯林における高解像度 3次元モニタリングによる
生物多様性・機能的多様性の評価手法の開発
平成 28 ～ 30 年度
Development of methodology for species and functional diversity
assessment in Southeast Asian tropical forests using by
high-resolution 3D monitoring technique
FY2016 ～ 2018

2019 年 12 月 20 日発行

編 集 国立環境研究所 編集分科会

発 行 国立研究開発法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

E-mail: pub@nies.go.jp

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

December 2019

組 版 株式会社 イ セ プ

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

無断転載を禁じます

国立環境研究所の刊行物は以下の URL からご覧いただけます。
<http://www.nies.go.jp/kanko/index.html>