

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05719

研究課題名(和文) インドネシアの石炭採掘跡地の森林造成における生育阻害環境因子の把握と樹種特性

研究課題名(英文) Evaluation of environmental constraints and species characteristics of planting species for the reforestation of ex-coal mining sites in Indonesia

研究代表者

則定 真利子 (Norisada, Mariko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：00463886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：石炭採掘跡地における森林再生技術を確立するための基礎的知見を得ることを目的に、造林候補樹種の環境ストレス応答特性を把握するための水耕栽培実験を行った。Melaleuca cajuputi、Eucalyptus camaldulensis、Acacia mangiumを対象に、根圏低酸素ストレスと極強酸性ストレスが成長と根の窒素吸収能に与える影響を明らかにした。M. cajuputiとE. camaldulensisを含む6種のフトモモ科樹木について、根圏低酸素ストレスが過剰Alストレス耐性に与える影響を明らかにした。M. cajuputiの根端の細胞壁のAl吸着性とペクチンの性状を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

森林再生の対象となる現場では、造林木の生育を阻害する環境ストレスがひとつであることはまずなく、複数の環境ストレスが複合的に造林木に負荷される。根圏低酸素ストレスが熱帯造林木に与える影響に関する知見は非常に限られている上に、根圏低酸素ストレスが熱帯樹木の極強酸性ストレス応答や過剰Al耐性に与える影響についてはほとんど知見がない。本研究で得られた知見は、石炭採掘跡地における森林再生を進める上で有用であるだけでなく、そのほかの熱帯荒廃地での森林再生を進める上でも有用である。

研究成果の概要(英文)：To obtain basic knowledge for establishing reforestation techniques for former coal mine sites, hydroponic experiments were conducted to understand the environmental stress response characteristics of candidate tree species for reforestation. Responses of growth and nitrogen uptake capacity to rhizospheric hypoxia stress and extreme acidity stress have been examined in Melaleuca cajuputi, Eucalyptus camaldulensis, and Acacia mangium. For six Myrtaceae species including Melaleuca cajuputi and Eucalyptus camaldulensis, effects of rhizospheric hypoxia stress on excess aluminum tolerance have been examined. The root tips of Melaleuca cajuputi, which is extremely tolerant to excess aluminum, were examined for their cell wall characteristics, focusing on aluminum adsorption and pectin properties.

研究分野：樹木環境生理学

キーワード：根圏低酸素ストレス 極強酸性ストレス 過剰Alストレス Melaleuca cajuputi Eucalyptus camaldulensis Acacia mangium 成長 窒素吸収

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

熱帯地域における開発にともなう森林の減少は、その速度に低減傾向があるものの依然として続いており、生物資源枯渇、水土保全、生物多様性、地球温暖化等の観点から大きな問題となっている。熱帯荒廃地において森林を再生することは、地域環境の観点からも地球環境の観点からも重要であるが、荒廃地の立地環境が厳しいため、従来の造林法を適用できない場合が多く、造林技術の開発が課題となっている。

国連食糧農業機関 (FAO) が 5 年ごとに取りまとめている世界森林資源評価 (Global Forest Resources Assessment) によれば、国ごとの森林の面積の減少において、インドネシアは、2010-2015 年の期間ではブラジルに次いで世界第二位、2015-2020 年の期間ではブラジル、コンゴ共和国について第三位にあり (FAO 2016, 2020) その主な要因の 1 つとして石炭採掘がある。インドネシアのカリマンタン島やスマトラ島では、90 年代以降、石炭開発が積極的に進められ、国家財政の重要な収入源となっている。開発前は森林であり、有用樹であるフタバガキ科樹木等が優占する、種が多様で生産量も大きい熱帯多雨林が分布していたところもあり、露天掘りによる植生の消失と大規模な地形改変は、生物資源利用の面からも生物多様性の面からも大きな影響を及ぼしている。インドネシアでは採掘跡地の再造林が石炭開発会社に義務づけられているが、表層土壌を取り除いた後の下層土は土壌の物理化学性が劣悪であり、重機の走行による圧密によって物理性がますます悪くなり、さらに植生の消失により土壌表層が直射日光に晒され温湿度環境も悪いため、植物の生育にとって非常に過酷な環境となっている。植生被覆がないために雨水による土壌侵食の問題も顕在化している。また、石炭層中にはパイライト ( $\text{FeS}_2$ ) が含まれるため、採掘によりそれが雨水に晒され酸化することにより、極度に酸性で鉄を多く含む水が発生し、土壌環境のさらなる悪化をもたらしている。このように石炭採掘跡地の環境は植物の生育にとって非常に過酷であるため、再造林はたやすいものではない。困難な再造林を放棄してしまう石炭開発会社も多く、露天掘りによって地形が大きく改変されたまま裸地化している地域が拡大している。石炭開発は非常に大規模な面積で行われるため、その環境負荷は量的にも極めて大きい。

*Acacia mangium* Willd. や *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth、*Falcataria moluccana* (Miq.) Barneby & J.W. Grimes、*Samanea saman* (Jacq.) Merr.、*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. など一部の樹種については植栽可能樹種としての実績があるが、これらの種でも活着しない場合や、活着してもその後の成長が悪い例が少なくない。また、平坦地の数 m スケールの狭い範囲でも活着や生残に大きな差異がある場合が少なくない。上述のように石炭採掘跡地が劣悪な環境であることから考えると、これらの原因には立地環境の違いがあると思われるが、そもそも立地環境を面的な拡がりをもって解析をした例自体が限られている上に、立地環境と植栽木の生残・成長との関係を定量的に解析した例はないため、原因が明らかとなっていない。立地環境と植栽木の生残・成長との関係を定量的に解析することによって、阻害要因の抽出が可能となり、またそれに対する耐性の樹種間差を明らかにすることができ、科学的根拠に裏打ちされた、応用可能性を備えた造林技術の確立が可能となる。

### 2. 研究の目的

当初は、石炭採掘跡地における森林再生技術を確立するための基礎的知見を得ることを目指して、湛水と低 pH に焦点を当て、インドネシア東カリマンタン州の石炭採掘跡地において、環境要因と植栽木の生残・成長との関係を解析して造林特性を把握すると同時に、栽培実験により、これらの環境ストレスに対する造林候補樹種の応答特性の把握とその特性の背景を探り、造林指針を提示することを最終的な目的としていた。しかしながら、現地試験地の設定が管理上の問題等から研究開始時に遅れ、その後、新型コロナウイルス感染拡大にともなう海外渡航の停止により、現地調査の実施ができなくなったため、造林候補樹種の環境ストレス応答特性を把握することに目的を絞り込み、研究を実施した。

### 3. 研究の方法

根圏環境を制御しやすく、また分析のための根の試料を、迅速にかつ傷害を最小限に抑えながら採取できる利点を重視して、栽培実験には水耕栽培系を用いた。砂を培土とした播種床から適当な大きさの実生を水耕栽培系に移植し、適宜馴化させた後、実験に供した。実生に根圏低酸素ス

トレスを負荷する際には、水耕液への通気を空気通気から窒素通気に切り替えることにより、水耕液の溶存酸素濃度を低くした。

#### (1)根圏低酸素ストレスと極強酸性ストレスが熱帯樹木の生育に与える影響

*Melaleuca cajuputi* Powell、*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.、*Acacia mangium* Willd.を対象に、pH 3の極強酸性ストレスの生育への影響が根圏低酸素環境によってどのように異なるかを調べた。根圏酸素環境については、水耕液の酸素濃度が約7 mg/Lの好気条件と1 mg/L以下の根圏低酸素条件を設け、培養液のpHとしては通常のpH 5.8と極強酸性のpH 3とを設定し、酸素環境とpHの組み合わせで4処理区を設けた。

##### [成長応答]

生物環境調節実験室（自然光、30 /25）において、4処理区で実生を12日間栽培し、個体の成長と成熟葉の光飽和光合成速度と気孔コンダクタンスの推移を処理区間で比較した。処理終了時に根の試料を採取し、根のアデニル酸量を測定してエネルギー充足率を評価した。

##### [窒素吸収能の応答]

根圏低酸素ストレスと極強酸性ストレスが根の窒素吸収能に与える影響を調べるため、窒素安定同位体（<sup>15</sup>N）を用いた標識実験を植物育成装置（人工光、30 /25、明期16時間/暗期8時間）を用いて行った。4処理区（*Eucalyptus camaldulensis*は好気条件下の2処理区のみ）で実生を24時間処理し、明期2時間目に<sup>15</sup>Nで標識したアンモニウムイオンを含む水耕液に根系を20分間浸した。20分間の<sup>15</sup>N曝露後に通常の水耕液に戻して翌暗期の終了時に実生を回収し、根・茎・葉に分けて乾燥した。<sup>15</sup>N曝露時から実生を回収するまでの水耕液の酸素濃度とpHは処理区と同じ条件とした。安定同位体比質量分析装置を用いて各器官の<sup>15</sup>N濃度を測定し、窒素吸収能を評価した。*Melaleuca cajuputi*では、硝酸イオンの吸収能に与える影響についても調べた。

#### (2)根圏低酸素環境下における過剰Alストレス耐性

*Melaleuca cajuputi*と*Eucalyptus camaldulensis*を含む6種のフトモモ科樹木について、根圏低酸素ストレスがAl過剰ストレス耐性に与える影響を明らかにするために、好気条件と根圏低酸素条件それぞれにおいて、水耕液にAlを含まない処理区とAlを含む処理区を設けた栽培実験を生物環境調節実験室（自然光、30 /25）において行った。両種のほかに供試した種は、*Melaleuca bracteata* F. Muell.、*Melaleuca viridiflora* Sol. ex Gaertner、*Eucalyptus grandis* W. Hill、*Eucalyptus pellita* F. Muellである。過剰Alストレスとして2 mMのAl濃度を設定して7日間栽培し、過剰Al耐性の指標となる根の伸長速度の応答を比較した。初期応答を把握するため、Al過剰ストレスとして1.5 mMのAl濃度を設定して4日間処理した実験を行った。

#### (3)*Melaleuca cajuputi*の細胞壁特性

##### [根端の細胞壁のAl吸着特性]

過剰Alストレスに対して極めて高い耐性を備えている*Melaleuca cajuputi*の根端の細胞壁の特性を、Al吸着性とペクチンの性状に着目して他の熱帯樹木と比較しながら解析した。

過剰Alストレスに対して耐性のあるフトモモ科樹木である*Melaleuca cajuputi*と*Syzygium cinereum* (Kurz) P. Chantaranothai and J. Parnellの細胞壁のAl吸着特性を、耐性のない*Melaleuca bracteata*と比較した。生物環境調節実験室（自然光、30 /25）において、Alを含まない水耕液と0.4 mMのAlを含む水耕液とでそれぞれ4日栽培した実生の根端約2 cmを採取して細胞壁画分を調製してカラムに充填し、0.4 mM Alを含む0.35 mM Ca溶液を通液してAlの吸着能を評価した。

##### [根端の細胞壁のペクチンの量と性状]

根圏低酸素環境下における過剰Alストレス耐性を評価した上記の栽培実験において、根圏低酸素ストレスによるAl耐性への影響が異なっていた*Melaleuca cajuputi*、*Eucalyptus camaldulensis*、*Melaleuca viridiflora*を対象に、影響の種間差の背景に根端の細胞壁のペクチンの量と性状が関わっている可能性を探った。*Melaleuca cajuputi*は、過剰Alストレスに対する耐性が根圏の酸素条件による影響を受けず、低酸素条件下でも高い耐性が発揮されるのに対して、*Eucalyptus camaldulensis*は、根圏低酸素条件下で耐性が弱まる。一方、*Melaleuca*

*viridiflora*は、根圏低酸素条件下で好気条件に比べて過剰AI ストレスに対する耐性が高まる。好気条件と根圏低酸素条件それぞれにおいて、水耕液に AI を含まない処理区と AI を含む処理区を設けて実生を4日間処理した後、根端約3 cmを採取し、細胞壁画分の熱水可溶ペクチンの量とペクチンのメチルエステル化度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1)根圏低酸素ストレスと極強酸性ストレスが熱帯樹木の生育に与える影響

[成長応答]

*Melaleuca cajuputi*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Acacia mangium*について、12日間の栽培実験を行ったところ、極強酸性ストレスに対する成長の応答性に根圏低酸素ストレスが与える影響が種によって異なった。*Eucalyptus camaldulensis*では、好気条件でも極強酸性ストレスにより樹高成長が低下したが、根圏低酸素条件ではその低下の程度が著しく強まった。本種は、根圏低酸素条件では、極強酸性ストレスにより処理後1日目から気孔が閉鎖し、光飽和光合成速度が低下した。また処理終了時、好気条件下では、極強酸性ストレスにより根のエネルギー充足率が低下し、低酸素条件下では、極強酸性ストレスにより根のエネルギー充足率は低下しなかったものの、根の総アデニル酸量が減少した。本種では、極強酸性ストレスによる根の機能阻害が根圏低酸素環境下でより顕著となり、その結果、吸水機能の低下により気孔が閉鎖して光合成が低下し、成長が阻害されたと考えられる。*Acacia mangium*では、根圏低酸素条件では好気条件に比べて成長が抑制されたが、極強酸性ストレスによる成長の抑制は、好気条件においても低酸素条件においても認められなかった。葉の気孔コンダクタンスと光飽和光合成速度についても、根圏低酸素条件では好気条件に比べて低下したが、極強酸性ストレスによる低下は認められなかった。根圏低酸素ストレスによる根の機能阻害により吸水が不十分となり、気孔が閉鎖して光合成が低下し、成長が阻害されたと考えられる。*Eucalyptus camaldulensis*では、根圏低酸素条件下で極強酸性ストレスを負荷されると、葉の気孔コンダクタンスが著しく低下して光飽和光合成速度が対照区の1/5以下まで大きく低下したのに対して、*Acacia mangium*では、気孔コンダクタンスがある程度維持され、光飽和光合成速度も対照区の6割程度に維持されていた。*Acacia mangium*は、根圏低酸素ストレスの影響は受けるものの、極強酸性ストレスに対する耐性は*Eucalyptus camaldulensis*に比べて高いと思われる。*Melaleuca cajuputi*では、好気条件では成長や光合成が極強酸性ストレスによって阻害されることはなく、根圏低酸素条件でも極強酸性ストレスによる阻害は生じなかった。*Melaleuca cajuputi*は、極強酸性ストレスに対する耐性が*Eucalyptus camaldulensis*に比べて高く、その耐性が根圏低酸素条件でも維持されることが明らかとなった。

[窒素吸収能の応答]

24時間の極強酸性ストレスが窒素吸収能に与える影響を調べたところ、好気条件下では、*Melaleuca cajuputi*と*Eucalyptus camaldulensis*の窒素吸収能は極強酸性ストレスによる影響を受けなかったが、*Acacia mangium*では極強酸性ストレスにより窒素吸収能が4割程度に低下した。根圏低酸素条件による根の窒素吸収能の低下は*Melaleuca cajuputi*, *Acacia mangium*のいずれにおいても認められなかった。*Melaleuca cajuputi*について、硝酸イオンの吸収能に対する根圏低酸素ストレスと極強酸性ストレスの影響を調べたところ、低酸素ストレスによる影響はなかったが、極強酸性ストレスによって吸収能が4割程度高まった。

成長応答試験において根圏低酸素ストレスによって成長が阻害された*Eucalyptus camaldulensis*や*Acacia mangium*では気孔の閉鎖が生じていたことから、根の吸水機能の阻害がその背景にあることが示唆された。また、<sup>15</sup>N 標識実験においてアンモニウムイオンの吸収能が低酸素ストレスで阻害されなかったことから、成長阻害の要因は、養分吸収能の阻害ではなく吸水機能の阻害によるものであると考えられる。ただし、今回の<sup>15</sup>N 標識実験では24時間という短い時間での応答を調べているため、より長期的には養分吸収能への影響もある可能性はある。*Acacia mangium*は、アンモニウムイオンの吸収能が24時間の極強酸性ストレス処理により4割程度に低下したが、成長応答試験では極強酸性ストレスによる生育阻害が認められなかった。アンモニウムイオンの吸収能に長期の極強酸性ストレスに対する馴化力がある可能性がある。

##### (2)根圏低酸素環境下における過剰AI ストレス耐性

2 mMの過剰AI ストレス下で7日間栽培したときの根の伸長を調べたところ、供試した6種のフ

トモモ科樹木のうち、*Melaleuca bracteata*と*Melaleuca viridiflora*以外の種は、好気条件では過剰 AI ストレスによって根の伸長が阻害されることはなかった。*Eucalyptus camaldulensis*では、好気条件では過剰 AI ストレスによって根の伸長が阻害されなかったのに対して、根圏低酸素条件では根の伸長が阻害された。*Eucalyptus camaldulensis*におけるこの現象は、AI 過剰ストレスとして 1.5 mM の AI 濃度を設定して 4 日間栽培した実験においても確認され、本種では、根圏低酸素ストレスによる過剰 AI ストレス耐性の弱화가ストレス負荷初期の段階で生じることが明らかとなった。7 日間の栽培実験に供したいずれの種についても、根圏酸素条件によって根の AI 濃度が影響を受けることはなかった。*Eucalyptus camaldulensis*は、6 種のなかで唯一、根圏低酸素ストレスによって AI 過剰ストレス耐性が弱化する種であるが、その原因が根への AI の蓄積の増大によるものではないことが明らかとなった。*Eucalyptus camaldulensis*の根には AI と結合して無毒化する機能をもつエノテイン B が含まれており、それが本種の AI 耐性に関与していることが報告されている (Tahara et al. 2017)。エノテイン B の生合成に関与する酵素 (gallate 1-beta-glucosyltransferase)の活性を*Eucalyptus camaldulensis*の根端において調べたところ、根圏低酸素ストレス下で活性が抑制されることが明らかとなった。*Eucalyptus camaldulensis*の AI 耐性が根圏低酸素ストレス下で弱化する背景には、根端における本酵素の活性の低下によるエノテイン B の合成の抑制が関与していることが示唆された。*Melaleuca viridiflora*では、過剰 AI ストレスによる根の伸長阻害の程度が低酸素条件下で好気条件に比べて弱まるという面白い現象が見られた。

### (3)*Melaleuca cajuputi*の細胞壁特性

#### [細胞壁の AI 吸着特性]

細胞壁の AI 吸着性に供試した 3 種の間で違いはみられたものの、耐性種のほうが非耐性種に比べて根端の細胞壁の AI 吸着能が低いとはなかった。

#### [ペクチンの性状]

根圏低酸素条件による AI 耐性への影響の種間差の背景に根端の細胞壁のペクチンの性状が関わっている可能性を探るために、細胞壁の熱水可溶ペクチン含量とペクチンのメチルエステル化度の根圏低酸素ストレスと過剰 AI ストレスに対する応答性を調べた。いずれの種においても熱水可溶ペクチンの細胞壁当たりの含量が過剰 AI ストレス下で減少した。ペクチンのメチルエステル化度については、定量性に問題を残している状態での定性的な評価となったが、いずれの種においても過剰 AI ストレスによりメチルエステル化度が高まった。いずれの応答も細胞壁における AI の吸着部位が減ることに繋がるため、過剰 AI ストレスによる細胞伸長の阻害を緩和する方向の適応的な応答であると言える。しかしながらこれらの AI 応答性に対する根圏低酸素条件の影響はいずれの種においても認められなかった。熱水では抽出されないペクチンの量の AI 応答性に対する根圏低酸素条件の影響が種間で異なる可能性もあり、根圏低酸素条件による AI 耐性への影響の種間差と根端の細胞壁のペクチンの性状との関連を探るためには、今後のさらなる解析が必要である。

#### 引用文献

- FAO. (2016) Global Forest Resources Assessment 2015: How are the world's forests changing? (2nd ed.). Rome.
- FAO. (2020) Global Forest Resources Assessment 2020: Main report. Rome.
- Tahara K, Hiradate S, Hashida K, Shinohara K. (2017) An aluminum-resistance mechanism in *Eucalyptus camaldulensis*: complexation between aluminum and oenothetin B in presence of organic acids in vitro. Journal of Forest Research 22: 261-264. DOI: 10.1080/13416979.2017.1326656

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山ノ下卓, 則定真利子, 小島克己
2. 発表標題 低Ca濃度下でAlが熱帯フトモモ科樹木の根の伸長に及ぼす影響
3. 学会等名 第132回日本森林学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 則定真利子、伊東瑠実子、山ノ下卓、小島克己
2. 発表標題 根圏pH環境が熱帯樹木の根圏低酸素ストレス応答に与える影響
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山ノ下卓、伊東瑠実子、則定真利子、小島克己
2. 発表標題 低酸素環境下での熱帯樹木の根のフェニルアラニン-アンモニアリアーゼ活性
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yu H, Norisada M, Yamanoshita T, Kojima K
2. 発表標題 The combined stress effect of rhizospheric hypoxia and excess aluminium on Myrtaceae species
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 則定真利子、山ノ下卓、小島克己
2. 発表標題 根圏低酸素および低pHのストレスが <i>Melaleuca cajuputi</i> の窒素吸収に与える影響
3. 学会等名 第133回日本森林学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山ノ下卓、則定真利子、小島克己
2. 発表標題 フトモモ科樹木の根端の細胞壁のAI吸着特性
3. 学会等名 第133回日本森林学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉沢拓真、山ノ下卓、則定真利子、小島克己
2. 発表標題 根圏低酸素下での過剰 AI が与えるフトモモ科樹木の根端内ペクチンへの影響
3. 学会等名 第133回日本森林学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------