

平成 22年6月9日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380088
 研究課題名（和文） 樹幹の漏脂現象の機構解明を目的とした病理学的、生理学的、分子生物学的研究

研究課題名（英文） Pathological, physiological and molecular biological studies on the mechanism of traumatic resin duct formation and resin production on stems of woody plants.

研究代表者

山本 福壽 (YAMAMOTO FUKUJU)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：60112322

研究成果の概要（和文）：ヒノキ科樹木の漏脂現象（ヒノキ漏脂病など）に関連した傷害樹脂道の形成機構を検討した。樹幹の連続的な漏脂現象には傷害刺激の伝達物質であるエチレン、ジャスモン酸、およびサリチル酸の濃度バランスが関与しているようであった。またエチレンの前駆物質である ACC 合成酵素の遺伝子発現も確認した。さらにタイ王国において *Aquilaria crassna* を用いて樹幹内の沈香成分沈着に関する刺激伝達物質の役割についても検討し、生産促進処理技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：Pathological, physiological and molecular biological mechanisms of traumatic resin duct formation and resin production on stems of Cupressaceae species infected by fungi such as *Cistella japonica* were studied. Roles of ethylene and jasmonic acid were essential in resin duct formation and resin production. Salicylic acid also has an important role in those phenomena. Relationships between accumulation of sesquiterpenes and those chemicals in stems of *Aquilaria crassna* trees also were studied in Thailand.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：ヒノキ科、漏脂病、エチレン、ジャスモン酸、サリチル酸、*Aquilaria crassna*

1. 研究開始当初の背景

樹木にはさまざまな樹脂漏出をともなう樹幹の病理現象があるが、ヒノキやヒノキアスナロ（アテ）の漏脂病もその一つである。漏脂病は *Cistella japonica* 菌の関与が提唱されて以来、同菌による発症のメカニズム解明に焦点が移ってきている。さらにヒノキ科樹種に広く樹脂胴枯病を引き起こす *Seiridium unicorne* 菌の感染機

構についても研究が進んでいる。しかしながら、病原菌の感染からサリチル酸、ジャスモン酸、エチレンなどの生合成過程をへて、可視的な漏脂現象の発現にいたるまでの発症メカニズムの全容は明らかではなかった。

2. 研究の目的

傷害に対する植物の抵抗反応は、傷害部分からの病原性微生物の侵入や二次的な虫害の

防御と密接に関わっている。この反応の一つである樹脂分泌の機能は、抗菌作用を持つ樹脂によって傷害部を保護し、病原性微生物の感染や昆虫類の侵入を防ぐことにある。この樹脂を分泌する樹脂道は、エピセリウム細胞と呼ばれる柔細胞に囲まれた細胞間隙である。樹脂道には、健全な形成層から作られた正常材や内樹皮に樹脂道(正常樹脂道)を持つマツ属のような樹種と、無傷の木部や内樹皮には樹脂道がなく、傷害を受けた時にのみ特異的に「傷害樹脂道」が形成される樹種がある。樹脂の分泌は樹幹に生じた病害や傷害に対する重要な防御反応である。しかしながら、ヒノキ漏脂病や樹脂胴枯れ病のように樹脂が持続的、かつ過剰に流下する樹病がある。ヒノキ漏脂病はヒノキ、ヒノキアスナロをはじめとするヒノキ科樹種の樹幹に発症する。傷害樹脂道の分化には、刺激伝達物質としての植物ホルモンの生理作用が重要な役割を果たしている。傷害を受けた際、生合成される植物ホルモンとしては、エチレンとジャスモン酸を挙げることができる。さらに植物の抵抗性獲得に関わる刺激伝達物質として挙げられるのがサリチル酸である。そこで本研究では、エチレン、ジャスモン酸、サリチル酸の相互作用を明確にし、傷害樹脂道形成のメカニズムを解明するとともに、造林地に大きな被害をもたらす漏脂病による過剰な樹脂流下の原因を突き止め、漏脂病に対する防除法や治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 病原菌の感染機構の解析

①ヒノキに対する *Cistella japonica* 接種とシグナル物質処理が樹脂道の形成と樹脂流出に与える影響:シグナル物質処理によってヒノキ漏脂病の病徴が再現されるかどうかを明らかにするため、ヒノキへのシグナル物質処理、および培養した病原菌の *Cistella japonica* 処理を行い、樹脂流出長、壊死斑面積、傷害樹脂道の形成、および病原菌の再分離率を調べた。供試木はヒノキ 15 本(平均胸高直径 19cm)を用いた。処理区は *C. japonica* 接種区、0.01% サリチル酸ナトリウム(SA)区、0.01% SA に 1% ジャスモン酸メチルと 1% エスレルの添加(JAetSA)区の3種である。接種区は供試木の地際から 1.2m の樹幹にあけた直径 1cm の穴へ、病原菌の菌糸を蔓延させた培地を封入した。SA 区と JAetSA 区は、各薬剤をラノリンに希釈してペーストとし、同様に封入した。対照として各個体の接種個所の反対側の樹幹へ、接種区の対照は培地のみを、SA 区と JAetSA 区の対照はラノリンのみを埋め込んだ。各処理は 2007 年 4 月に行い、各処理区で 5 本を用いた。処理後、約 1 カ月間隔で、処理部位からの樹脂流出長を計測した。8 月にはすべての処理部位を採取し、壊死斑面積の計測と接種

菌の再分離を行った。また処理部位から上方の師部を採取し、傷害樹脂道の有無を観察した。

②ヒノキとレイランドサイプレスの樹脂道形成に対する病原菌、エチレン、サリチル酸、およびジャスモン酸の影響:ヒノキ科樹木の樹脂道形成に関与する物質を明らかにするため、ヒノキアスナロ、ヒノキ、レイランドサイプレスに対してエチレン、サリチル酸、ジャスモン酸の塗布と樹脂胴枯病菌の接種を行い、それらが樹脂道形成に及ぼす影響を調べた。試験には石川県輪島市に植林された約 30 年生のヒノキアスナロ 30 本と、三重大学生物資源学部の圃場で育成した 3 年生のヒノキとレイランドサイプレス各 47 本を用いた。いずれもジャスモン酸メチル(JA)、サリチル酸ナトリウム(SA)、エチレンの発生剤であるエテホン(エスレル)(Et)をラノリンに希釈してペースト状にしたものを塗布した。処理区は、(a)ラノリン塗布のみの対照区、(b)5%JA、(c)5%SA、(d)1%Et、(e)5%SA+1%Etの5 つである。ヒノキアスナロでは 2005 年 4 月、6 月、8 月に各ペーストを無傷の樹幹に塗布した。処理約 2 か月後、処理部より採取した試料から小口面の組織切片を作成しサフラニンとファストグリーンで二重染色し、光学顕微鏡を用いて 1mm² あたりの樹脂道数と樹脂道面積を計測した。ヒノキとレイランドサイプレスには 2006 年 7 月に各ペーストを塗布すると同時に、それとは別の個体に PDA 培地上で培養した *Seiridium unicorne* の菌叢(直径 4mm)を樹幹に接種した。各処理区には、内樹皮に達する約 5mm の傷をつけた有傷部と無傷部を設けた。

③ヒノキ苗木の無傷および有傷部におけるジャスモン酸、エチレン、サリチル酸の影響:ヒノキ科樹木の樹脂道の形成に関与するシグナル物質を明らかにするため、エチレン、サリチル酸、ジャスモン酸の塗布処理と樹幹への傷付けを行い、それらが樹脂道形成に及ぼす影響を調べた。試験には 3 年生のヒノキとレイランドサイプレス(以下レイランド)を用いた。ジャスモン酸メチル(JA)、サリチル酸ナトリウム(SA)、エチレンの発生剤であるエテホン(日産エスレル 10; Et)を、ラノリンに混和してペースト状にしたものを供試木に塗布した。処理区は、ラノリン塗布のみの対照区(以下 Cont.)、5%JA(以下 JA 処理)、5%SA、1%Et(以下 Et 処理)、5%SA+1%Et の 5 区を設け、1 処理区ごとに 3 本の供試木を用いた。2006 年 7 月末、ヒノキとレイランドの地際からの高さ 9cm の樹幹にカッターナイフを用いて傷をつけた後、各ペーストを地際からの高さ 5-10cm の樹幹に塗布した。処理 2 ヶ月後に傷をつけた有傷部と傷をつけない無傷部を採取し、横断面の組織切片を凍結マイクロームによって作成し、サフラニンとファストグリーンで二重染色、光学顕微鏡を用いて師部に形成された傷害樹脂道を観察した。

(2) エチレン、ジャスモン酸およびサリチル酸の生理作用解析

①ヒノキ科樹種へのエチレン、ジャスモン酸、サリチル酸の処理:35年生ヒノキおよび36年生マアテを用いた。実験処理には、エチレンの発生剤であるエスレル(Et)、その他、ジャスモン酸メチル(JA-Me)と水溶性のサリチル酸化合物であるサリチル酸ナトリウム(SA-Na)をラノリンペーストとして用いた。処理区は、Et1%、JA-Me1%、Et1%+JA-Me1%にSA-Naの濃度を0、0.01、0.1、1、5%に変えて混合した計20処理区を設定した。供試木の高さ1.3mの樹幹表面に対し、外樹皮を剥いだ後、径2cmの範囲にペーストを塗布した。ヒノキの処理は2008年6月14日に行い、樹脂道の形成を調べるため内樹皮を7月28日に採取した。マアテは、処理を5月24、25日に行い、約1ヶ月後の7月9日に内樹皮を採取、組織切片を作成し、樹脂道の面積を光学顕微鏡によって測定した。

②ヒノキ科樹種のサリチル酸化合物に対する反応の違い:ヒノキ、マアテに対しSA-Me1%、Et1%+SA-Me1%、JA-Me1%+SA-Me1%、およびEt1%+JA-Me1%+SA-Me1%の4処理を行った。また、(1)実験の対照区およびSA-Na処理での結果と比較し、サリチル酸化合物の性質の違いが樹脂道面積、樹脂道個数、樹脂流下に及ぼす影響を調べた。

③ヒノキ苗木へのエチレン、ジャスモン酸、サリチル酸の処理:4年生のヒノキ苗木の主軸に濃度を調節したサリチル酸ナトリウム(SA-Na)、エスレル(Et)、ジャスモン酸メチル(JA-Me)をラノリンに混合し表面に塗布した。処理は、対照区、SA-Na1%、Et1%、JA-Me1%、Et1%+SA-Na1%、Et1%+JA-Me1%、Et1%+JA-Me1%+SA-Na1%の計7処理区である。処理は、2008年7月31日に行った。薬剤塗布後、揮発を防ぐために処理部をアルミホイルで覆い、ガムテープで固定した。繰り返しは、各処理区10本である。また、処理から約1ヵ月後の9月1日に処理部を採取し、横断切片を作成し、光学顕微鏡で観察、樹脂道面積と樹脂道個数および当年生木部にある樹脂細胞を測定した。

(3) 病原菌感染にともなう刺激伝達物質の生合成の遺伝子解析 -ACC合成酵素の検出-

ヒノキ漏脂病罹患部におけるエチレン生合成に関わるエチレン前駆物質のアミノシクロプロパンカルボン酸(ACC)の生合成を制御するACC合成酵素cDNAの単離を行った。2008年7月、石川県輪島市に植栽されている32年生ヒノキアスナロ(品種名マアテ)の漏脂病に罹患している個体から分析試料を得た。試料は罹患部の壊死斑周辺から内樹皮を切り取り、ただちにドライアイスで凍結して鳥取大学に持ち帰った。対照

として罹患部から離れた壊死斑のない健全部の内樹皮を採取した。試料は-80℃で保存した。

(total RNAの抽出):hot borate法により行った。保存しておいた試料を乳棒およびホモジナイザーを用いて液体窒素中で粉末になるまで粉砕した。これに80~90℃に保持しておいたXT Buffer(pH 9.0)とProteinase K(20mg/ml)を加え、42℃で1.5時間振とうし、RNAを溶出させた。続いて最終濃度が160mMになるようにKClを加え、氷中に1時間おいてタンパク質を除去したのち、遠心分離して上清を回収した。上清に最終濃度が2MになるようにLiClを加え、氷中で一晩おき、RNAを沈殿させた。遠心分離後、上清を除去し、ペレットを2M LiClで数回すすいだ。ペレットは10mM Tris-HCl(pH 7.5)に溶解させた後、1/10倍量の2M K-acetate(Ph 5.5)を加えて多糖類や不溶物を除去した。遠心分離後、上清に100% ethenolを加えRNAを沈殿させた後、DEPC液に溶解した。抽出したRNAの濃度は分光光度計で測定した。濃度の算出はOD₂₆₀=1の時のRNA濃度を40ng/ μ lとして行った。

(一本鎖cDNAの合成):Firststrand cDNA Synthesis Kit ReverTra Ace- Ace- α Toyobo)を用いて行った。total RNA 1 μ gにd(T)₂₀Primerを加え、65℃で熱変性を行った。冷却後、RNase Inhibitor および5 unit ReverTra Ace- α 、50mM dNTP、5x RT bufferを加え、42℃で45分、その後酵素不活化処理として99℃5分反応させ、一本鎖cDNAを合成した。この一本鎖cDNAを鋳型として、さらにRT-PCRにより約1.1kbp断片が増幅した。反応は94℃1分、57℃1分、72℃2分 x 40サイクルの条件で行い、プライマーにはすでに単離されているACC合成酵素の保存領域の塩基配列を基に作成したものを使用した。以下プライマー配列を示す。

ACSu1: 5'-ATICARATGGGIYTIGCIGARAAYCA-3'

ACSd1: 5'-GCRAARCAIACICKRAACCAICCGGYTC-3'

(PCR増幅断片の切り出し及び生成):得られた増幅断片1.1kbは0.7%アガロース(GTG Seakem)で電気泳動したのち、切り出した。これをSephaglasTM Bandprep Kit(GE Healthcare)を使用して精製した。切り出したゲルに3倍量のGel Solubilizerを加え、55℃で保持し、ゲルを溶解させた。これにSephaglasTM BPを加え、DNAを吸着させた。さらに遠心分離後、ペレットをWash solutionで洗浄した。遠心分離後、上清を除去し、完全に風乾した。これに滅菌水を適量加えて懸濁し、DNAを溶出させた。この1.1kbpを含むプラスミドDNAを用いてその塩基配列を決定した。

(ライゲーション):精製したインサートはpGEM T easy Vector(Promega)を用いてTAクローニングを行った。反応液組成は2x buffer、インサート、

pGEMT easy Vector, T4 DNA Ligase で全量 10 μ l に調整し、16°C で 16 時間反応させた。

(コンピテントセルの調整): 1000ml の三角フラスコに 70ml の SOB 液体培地 (2.0% Bacto Trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 10mM NaCl, 10mM MgSO₄) と宿主菌 XL-1 Blue を少量加え、23°C で波長 600nm の吸光度 0.4~0.8 になるまでロータリーシェイカーで激しく振とう培養した。培養液は速やかに冷却し、遠心分離し上清を除去した。沈殿に培養液の 1/3 倍量の氷冷した TB 溶液 (10mM PIPES, 15mM CaCl₂·2H₂O, 250mM KCl) を加え懸濁した。氷冷したのち遠心分離し、上澄みを取り除いた。培養液の 1/12.5 倍量の氷冷 TB 溶液を加え、最終濃度が 7% になるように DMSO を加え、氷冷した。これを 1.5ml エッペンに分注し、液体窒素で急冷したのち -80°C で保存した。

(トランスフォーメーション): 宿主菌 XL-1 Blue を氷上で溶解させ、抽出したプラスミド DNA をコンピテントセルの 1/10 量を加えて氷上で 25 分間反応させた。これを 42°C で 1 分間保持したのち、氷中で 2 分間冷却した。これにあらかじめ 37°C で保温しておいた SOC 液体培地 900ml を加え、37°C で 55 分間インキュベートした。遠心して集菌し、これを上清の一部とよくピペティングし、LB 寒天培地に滴下し、コンラージ棒で塗り拡げた。プレートは裏返して 37°C で一晩培養した。

(プラスミド DNA の抽出): Flexi Prep Kit (GE Healthcare) を用いてプラスミド DNA を抽出した。寒天培地からシングルコロニーをアンピシリン溶液 50 μ g/ml 添加 LB 液体培地 (1% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 1% NaCl) 5ml に接種し、37°C で 14 時間振とう培養した。培養液 700 μ l と 70% グリセロール 500 μ l を混和し、保存菌として -80°C で保存した。残りの培養液を 2.0ml サンプリングチューブに移し、15000rpm、1 分遠心し、上澄みを取り除いた。Solution I を 200 μ l 加え沈殿を懸濁し、Solution II を 200 μ l 加え転倒混和、Solution III を 200 μ l 加え転倒混和し、15000rpm、5 分遠心分離した。上澄みを回収し、0.7 倍量のイソプロパノールを加え、混和後 1 分間静置、15000rpm、10 分遠心し、上澄みを取り除き風乾した。Sephaglas™ FP を 150 μ l 加え懸濁後 2 分間静置、15000rpm、30 秒遠心し、上澄みを取り除いた。Wash Buffer を 150 μ l 加え沈殿を懸濁し、15000rpm、30 秒遠心し上澄みを取り除いた。70% エタノールを 300 μ l 加え沈殿を懸濁し、15000rpm、30 秒遠心し、上澄みを取り除き風乾した。滅菌水を 50 μ l 加え、懸濁しながら 5 分間室温で静置、その後 15000rpm、1 分遠心し上澄みを回収、さらにもう 1 度遠心し上澄みを回収した。

(シーケンス解析): Big Dye Terminator v1.1

Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM310 Genetic Analyzer を用いた。得たプラスミド DNA 150ng にプライマーを 1 μ l、5× Sequencing Buffer を 2 μ l、Big Dye を 2 μ l 加え滅菌水で全量 10 μ l とし、蒸発を防ぐためミネラルオイルを重層した。反応条件は 95°C/5 分、次に 95°C/30 秒、60°C/4 分を 25 サイクル行い、4°C で保持した。反応液に滅菌水を 10 μ l 加え全量 20 μ l とし、3M 酢酸ナトリウムを 2 μ l、95% エタノールを 50 μ l 加え混和、室温で 15 分静置した。次に 15000rpm、20 分室温で遠心し、上澄みを取り除いた。70% エタノールを 150 μ l 加え、15000rpm、5 分室温で遠心、上澄みを取り除き風乾した。Hi-Di Formamide を 20 μ l 加え沈殿を融解し、95°C で 2 分間インキュベートし、氷中で 5 分間急冷した。塩基配列解析は DNASIS および BLAST で行った。

シーケンス用プライマーは

Univ (5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3')

Rev (5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGA-3')

であった。

(4) 樹脂分泌機構を基盤とした林業・林産業における新技術の開発

タイ王国における *Aquilaria crassna* 樹の沈香の生産促進処理: 沈香 (agarwood) は樹幹に生じた傷害や病害によって agarospirol や iso-agarospirol などの樹脂 (sesquiterpene 類) が複合的に木部に沈着したものであり、その成分は一様ではない。沈香を生産できる樹種は、熱帯アジアに分布するジンチョウゲ科アクイリア属の *Aquilaria crassna*、*A. agallocha*、*A. malaccensis* などである。2007 年の 9 月、タイ王国の Kasetsart 大学と共同で、*Aquilaria crassna* の樹幹に生じた傷害に対する応答にともなう沈香成分沈着の促進処理実験を行った。この方法については、現在、特許出願準備中であり、公表は差し控える。

4. 研究成果

(1) 病原菌の感染機構の解析

① ヒノキに対する *Cistella japonica* 接種とシグナル物質処理が樹脂道の形成と樹脂流出に与える影響: 各処理区の処理部位からの樹脂流出は 6 月に観察され始めた。接種区と JAEtSA 区では樹脂流出が観察されたが、SA 区では観察されなかった。7 月から 8 月にかけて樹脂流出が長くなり、接種区と JAEtSA 区では顕著であった。壊死斑面積については、接種区と JAEtSA 区では対照区よりも広がったが、SA 区では差異がなかった。これらの結果から JAEtSA の処理は、接種によって生じる病徴を再現していると考えられたが、SA の単独処理では病徴を再現できなかった。このことから、接種傷によって生産されるジャスモン酸やエチレンにサリチル酸を与えても樹

脂流出は起こらず、接種後の菌の伸長にヒノキが応じてジャスモン酸やエチレンを生産していると考えられた。

②ヒノキとレイランドサイプレスの樹脂道形成に対する病原菌、エチレン、サリチル酸、およびジャスモン酸の影響:ヒノキアスナロに対する試験では、処理区(e)において樹脂道数、樹脂道面積ともに他の処理区より有意に大きかった。処理区(b), (c), (d)の間には有意な差は見られなかった。このことから、エチレンとサリチル酸が共に作用したとき樹脂道の形成が促進されると考えられた。

③ヒノキ苗木の無傷および有傷部におけるジャスモン酸、エチレン、サリチル酸の影響:ヒノキの無傷部では、JA 処理とEt 処理で接線方向に連なる樹脂道の形成が観察された。一方、レイランドの無傷部では、JA 処理でのみ接線方向に連なる樹脂道の形成が観察された。ヒノキの有傷部では、Cont.で接線方向に連なる樹脂道が観察された。レイランドの有傷部では、Cont.において3 試料すべてで接線方向に連なる樹脂道が観察された。これらの結果から、傷害樹脂道は、ヒノキではジャスモン酸メチルもしくはエテホンを無傷の樹幹に処理することで、レイランドではジャスモン酸メチルを無傷の樹幹に処理することで、有傷処理と同様に形成されることが示唆された。

(2)エチレン、ジャスモン酸およびサリチル酸の生理作用解析

エチレン、ジャスモン酸処理により形成された傷害樹脂道は、ヒノキ、マアテの形成層付近に一列もしくは多列に出現した。傷害樹脂道の分化は、当年生の師部組織のみでなく、過去に形成された師部組織においても認められた。傷害樹脂道は、常に師部繊維と師部繊維の間に形成されている。また、構造から傷害樹脂道を取り巻いている細胞群はエピセリウム細胞であると考えられる。このエピセリウム細胞は、師部繊維と師部繊維の間で分化しており、師部柔細胞を起源にもつものであった。また、師部放射組織は樹脂道が分化した後も残り、傷害樹脂道の形成には関与しないようであった。

傷害樹脂道の分化に及ぼすエチレンの作用は、ヒノキの成木および苗木で確認できた。ヒノキの成木、苗木にエスレル 1%を処理することで傷害樹脂道の形成と樹脂道面積の拡大が顕著に促進された。また、成木での実験において、SA-Na の濃度増加がエチレンの働きを抑制する傾向を示し、特に SA-Na 5%において顕著であった。また、SA-Me 処理では、SA-Na よりもエチレンの働きを抑制する傾向を示した。これは、SA-Me と SA-Na の生理的な作用性の差異によるものかも知れない。

マアテでは、1%エスレル処理は、対照区を上回る傷害樹脂道の形成を引き起こさなかった。

また、SA-Na の濃度変化による反応の違いは認められず、抑制効果は現れなかった。SA-Me 処理においても抑制は認められず、ヒノキとの反応の差異が認められた。

ヒノキにおいてジャスモン酸による傷害樹脂道形成の誘導が認められた。樹脂道面積では、対照区と有意な差は認められなかった。しかし、樹脂道個数においては、対照区に比べて顕著な増加が認められた。この傾向は、ヒノキ苗木においても同様であった。しかし、苗木の場合、個々の傷害樹脂道の径が小さく面積の増加は明確ではなかった。また、成木の実験において、ジャスモン酸は、添加した SA-Na 濃度の増加に従って樹脂道面積が減少した。この傾向は樹脂道個数において顕著であった。また 1%の濃度域では、SA-Na よりも SA-Me 処理が樹脂道形成を抑制する傾向を示した。

マアテを用いた実験では、エチレン、ジャスモン酸処理は、樹脂道面積に有意な差は認められなかったが、樹脂道個数は、増加する傾向を示した。これは、SA-Na 0.01%と混合した場合において顕著であり、対照区に対し有意な差が認められた。このことから、マアテでは、ジャスモン酸が樹脂道分化には作用するが、樹脂道面積を拡大する作用は顕著ではないようである。また、低濃度の SA-Na は、ジャスモン酸と拮抗せず樹脂道分化を促進させた。

サリチル酸単体では、ヒノキ、マアテともに樹脂道が形成されなかった。しかし、2006 年の実験では、マアテ、ヒノキに対しエスレルと高濃度の SA-Na を混ぜた処理で顕著な樹脂道形成と樹脂生産が認められている。また、2007 年には、SA-Na の濃度を変え、エスレル、ジャスモン酸と混合してヒノキに処理を行った。この実験で、サリチル酸の濃度変化によって樹脂道形成と樹脂生産が変化し、低濃度のサリチル酸が樹脂道形成に関与していることを示唆する結果を得た。ヒノキにおいてサリチル酸は、エチレン、ジャスモン酸の働きを抑制する傾向が認められた。しかし、エチレン、ジャスモン酸がともに存在した場合、抑制は働かなかった。またエチレン、ジャスモン酸が共存した場合でも、SA-Na が 0.1%の場合には樹脂道面積は小さくなった。エスレル単体処理やジャスモン酸単体の処理では、樹脂道が形成されるものの樹脂の流下はあまり起こっていない。このことからサリチル酸が樹脂生産を促進する要因の一つであることが考えられる。本結果では、エチレン、ジャスモン酸のみでなく、サリチル酸が樹脂生産に関与していることが示唆された。

マアテでは、ヒノキと異なった反応が認められた。マアテの場合、エチレンの働きは小さく、また、ジャスモン酸に関しては、樹脂道形成を誘

導する働きを認めることができなかつた。しかし、エチレンとジャスモン酸が共存した場合、SA-Na濃度が0.1%以上で樹脂道面積が増加する傾向が認められた。これらのヒノキ、マアテの反応の差は、エチレン、ジャスモン酸、サリチル酸に対する感受性や最適濃度の差などによるものであると考えられる。特にジャスモン酸に関しては、兩種において反応に差が認められた。

本実験では、サリチル酸による、傷害樹脂道形成への影響を調べ、樹脂形成への関与を示唆する結果を得た。このことから、漏脂病の過剰な傷害樹脂道形成、樹脂流下にサリチル酸が関与していることが示唆された。また、樹脂道形成によって必ずしも樹脂流下が起こらなかったことから、傷害樹脂道形成と樹脂生産では、誘導に要求する刺激伝達物質の濃度が異なっている可能性が考えられる。しかし、エチレン、ジャスモン酸への相互作用に関して、未だ不明な点も多く、今後更なる研究が必要である。

(3) 病原菌感染にともなう刺激伝達物質の生合成の遺伝子解析 -ACC 合成酵素の検出-

上記の操作によって塩基配列を決定し、相同性を検索したところ、他植物のACC合成酵素と相同性があること、また壊死斑周辺の試料と健全部位の試料で2種類のタイプが存在することが確認できた。漏脂病罹患部に特異的に出現するACC合成酵素の可能性も考えられるが、さらに詳細な検討が必用である。

(4) 樹脂分泌機構を基盤とした林業・林産業における新技術の開発

タイ王国における *Aquilaria crassna* 樹の沈香の生産促進処理:この成果については、新しい知見とともに、沈香成分沈着の顕著な促進効果を認めた。しかしながら、その内容については現在、特許出願準備中であり、公表は差し控える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 村上裕作・松田陽介・中西健一・山本福壽・伊藤進一郎 2007. ヒノキとレイランドサイプレスの樹脂道形成に対する病原菌、エチレン、サリチル酸、およびジャスモン酸の影響 樹木医学研究 11(4), 201-202 (査読あり)

[学会発表] (計9件)

- ① Fukuju Yamamoto, Masaki Nakayama, Fumiko Iwanaga & Jiro Kodani 2009.8.4. Effects of application of ethrel, jasmonic acid and salicylic acid on resin duct formation in the bark of Cupressaceae species in relation to resinous pitch canker. The 7th Pacific Regional Wood Anatomy Conference (PRWAC). Kuala Lumpur, Malaysia
- ② 中山正規・田中陽子・森脇広之・岩永史子・小谷二郎・山本福壽 2009.3.27 ヒノキアス

ナロおよびヒノキ樹幹の傷害樹脂道の人為的形成 第120回日本森林学会大会(京都大学)

- ③ 山本福壽・小谷二郎 2009.3.19 ヒノキ科樹木の漏脂病発症の謎 第56回日本生態学会大会(岩手県立大学)
- ④ 中山正規・森脇広行・小谷二郎・山本福壽 2008.11.15. ヒノキ科樹皮の傷害樹脂道形成の人為的制御 第13回樹木医学会大会(茨城県立県民文化センター・水戸市)
- ⑤ 中山正規・森脇広行・小谷二郎・山本福壽 2008. 3.28 ヒノキ科樹皮の傷害樹脂道形成の人為的制御 第119回日本森林学会大会(東京農工大)
- ⑥ 山本福壽・中山正規・岩永史子・村上裕作・小谷二郎 2007.11.30 ヒノキ科樹種の漏脂現象におけるサリチル酸、ジャスモン酸およびエチレンの役割. 第12回樹木医学会大会(名古屋大学)
- ⑦ 村上裕作・松田陽介・中西健一・伊藤進一郎 2007. 11.30. ヒノキに対する *Cistella japonica* 接種とシグナル物質処理が樹脂道の形成と樹脂流出に与える影響 樹木医学会12回大会(名古屋大学)
- ⑧ 村上裕作・松田陽介・中西健一・伊藤進一郎 2007.4.3 ヒノキ苗木の無傷および有傷部におけるジャスモン酸、エチレン、サリチル酸の影響 第118回日本森林学会大会(九州大学)
- ⑨ 中山正規・村上裕作・岩永史子・小谷二郎・山本福壽 2007.4.3 サリチル酸、ジャスモン酸およびエチレン処理によるアテの樹脂道の人為的分化 第118回日本森林学会大会(九州大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 福壽 (YAMAMOTO FUKUJU)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号:60112322

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

伊藤 進一郎 (ITO SHINICHIRO)

三重大学

生物資源学部・教授

研究者番号:90092139

板井章浩 (ITAI AKIHIRO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号:10252876

(4) 研究協力者

小谷二郎 (KODANI JIRO)

石川県・林業試験場・研究員

研究者番号:40450811