

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780154

研究課題名（和文） 樹木実生の防御機能による初期定着サイト決定機構の解明

研究課題名（英文） The role of defense system of tree seedlings in the natural regeneration

研究代表者

市原 優（ICHIHARA YU）

独立行政法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員

研究者番号：10353583

研究成果の概要（和文）：森林生態系の天然更新において、樹木実生のもつ病原菌に対する防御機能に着目し、その初期定着サイト決定要因としての役割を調査した。異なる光環境下のブナ実生において、防御機能の発達程度と病原菌接種による枯死率を解析した結果、弱光条件では抗菌物質が低濃度であり枯死率が高かったのに対し、強光条件では抗菌物質の濃度が高まり生残率が高かったことから、実生の防御機能の発達が初期定着サイトを決定する要因の一つとなっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The role of defense system of tree seedlings was studied in relation to decisive factor of initial survival in the natural regeneration of *Fagus crenata*. Seedling survival rate and the concentrations of antifungal substances were higher under the higher light conditions than that under lower light conditions. This result indicates that progress of defense system in seedlings is one of the decisive factors of initial survival of the seedlings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：森林生態・保護・保全

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の影響予測によれば、日本のブナ林は大きな分布変動があり、消失する地域もあることが予想されている。しかし、このような計算上の予測では植生移動が実際に起こる際の生命現象は把握できず、実生からの天然更新プロセスと環境変化の影響を考慮しなければならない。

森林生態系における樹木の天然更新はギ

ャップダイナミクスに従っており、ブナの実生は閉鎖林冠下では光不足のために枯死し、林冠が開けたギャップで更新する。ブナでは当年生実生の死亡要因として、哺乳類や昆虫の食害に加え、病原菌による菌害が最大の要因となっている。これまでブナ実生の定着サイトの解明のために菌害発生率と光環境の関係が検討され、明るい光環境では菌害発生率が低いことが明らかになっており、近年は

光環境を左右するギャップサイズ、フェノロジカルギャップ、ササの一斉枯死などの要因が検討されている。しかし、菌害に対してブナがどのように身を守り生残するのか、については全く検討されてこなかった。

このような中、ブナ実生が菌害に対して抗菌物質と防御組織によって直接的に防御し生残することが明らかにされた。すなわち、明るい環境下では、胚軸に抗菌物質のカテキンとエピカテキンが多量に集積し病原菌 *Colletotrichum dematium* の伸長を阻害すると共に、コルク層（周皮）が発達して病原菌の侵入を阻害するため、ブナ実生は生残する (Ichihara and Yamaji, 2009, Yamaji and Ichihara, 2012)。この防御機能は、これまでの環境要因と枯死率の相関関係と異なり、菌害発生と直接関連づけられるものであり、菌害発生率を決定する要因解析には必要不可欠である。この防御機能は実生の光合成と二次代謝の結果として形成されるものであるため、実生のおかれた環境によって濃度や発達程度が変動する。この防御機能の変動と菌害発生率の関係から防御機能の閾値を求めることができると予想され、定着サイトの環境閾値を評価する新たな指標として有用であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、森林生態系の天然更新において、樹木実生のもつ病原菌に対する防御機能に着目し、その初期定着サイト決定要因としての役割を解明する。ここではブナ当年生実生の立枯れ病菌に対する防御機能のうち抗菌物質を指標として野外調査し、ブナ林の林床環境と実生の生死との対応関係から、ブナ実生の定着サイト決定因子としての役割を明らかにする。

(2) 実験室の環境コントロール下で、光環境を段階的に制御して実生に病原菌を接種し、菌の侵入に対する防御反応の差異を調査することによって、病原菌が侵入した時の防御機構の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ブナ林における林床の環境と実生の生残および実生の防御機能の関係を明らかにするため、ブナが優占する岩手県八幡平市の安比高原ブナ二次林において、20m×25mの試験地を設定した。試験地の中を5mおきに区切り、5m四方の方形区をサブプロットとした。試験地に発生したブナ当年生実生近傍にナンバーテープの旗を設置して目印をつけ、実生の位置、生死および死亡要因を2週間から1ヶ月おきに記録した。菌害により死亡した実生はサンプリングし、胚軸の腐敗部位を表面殺菌して麦芽寒天培地上に置

き、病原菌の分離を行った。

また、菌害発生時期に健全実生を各サブプロット毎に約10本ずつ採取した。サンプリングした実生は、胚軸部をメタノール抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより、カテキンを定量した。

林床の実生がおかれた環境を記録するために、サブプロットを2.5m四方に分割し、それぞれの中央付近で全天写真を撮影し、相対光合成光量子束密度 (rPPFD) を算出した。実生の生育するプロットのrPPFDとカテキン濃度の関係を調査した。

(2) 菌の侵入に対する防御反応の差異を明らかにするため、ブナ種子をビートモス入りのプラスチック鉢 (4×4×5cm) に植栽し、20℃の恒温室内で、光強度を強光、中光および弱光の3段階の処理区に分けて1ヶ月間栽培し、本葉の展開後に接種に供した。光強度の調節は寒冷紗により行った。

1%麦芽エキス寒天培地で20℃5日間培養した *C. dematium* の菌叢から直径1cmの寒天ディスクを切り取り、胚軸の表皮をカミソリで薄く剥いだ傷 (長さ1cm) に貼り付けて接種した。対照には無菌の培地を用いた。接種0、3、7および10日に各処理から4本ずつ採取し、長さ1cmの接種部を用いて、中央付近から解剖観察用の固定サンプルを採り、残りをメタノール抽出した。

解剖観察用サンプルは、グルタルアルデヒドで固定し、樹脂に包埋して木口面で薄切後、DMACA染色によりカテキン類の分布を光学顕微鏡観察した。メタノール抽出物は高速液体クロマトグラフィーにより、カテキンとエピカテキンを定量した。

4. 研究成果

(1) ブナ林に設置した試験地では、rPPFDが高い強光環境になるほど立枯病の発生率が低かった。プロット全体から立枯病菌が分離されたことから、強光環境のサブプロットにおいては、立枯病に対する防御機構が働いていることが推察された。

しかし、実生が生育するプロットのrPPFDが高いほど実生のカテキン濃度が高くなる傾向があったものの、その相関は低かった。このことは、実生のカテキン濃度は光環境の影響だけでなく、他の要因によっても影響されることを示唆している。土壌水分や温度などの他の環境要因の影響や、実生の生育ステージによる二次代謝物質の変動の関係を調査する必要がある。また、カテキン測定に用いた実生は菌の感染を受けていない健全実生であるため、この結果は、感染以前の静的防御においては、実生のもつ防御機能のうち抗菌物質の寄与が低い可能性を示していると考えられる。今後、周皮などの組織学

的防御機能を調査し、r P P F Dとの関連を明らかにする必要がある。

(2) 実験室内の異なる光環境下で栽培したブナ実生において病原菌を接種した結果、強光区では枯死実生は発生しなかったが、中光区と弱光区では接種7日後から胚軸の壊死による枯死が発生した。強光区と中光区の接種部では、周囲に黒褐色の変色部位が認められた。いずれの処理区においても、対照苗は枯死しなかった。

強光区における胚軸の病原菌接種部のカテキンとエピカテキン濃度は、中光区と弱光区より高い値で推移し、また強光区では対照よりも接種の方が高かった(図1)。中光区と弱光区共に、カテキンとエピカテキン濃度は、強光区とは逆に、接種よりも対照の方が高い値で推移した。

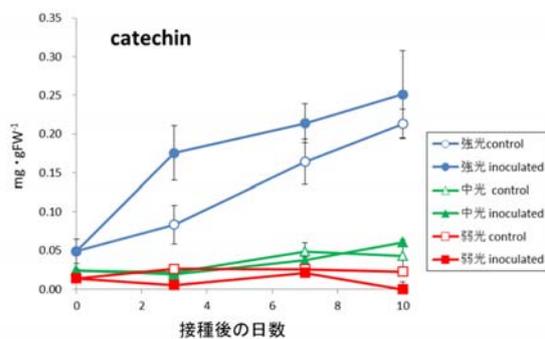


図1 異なる光環境下で病原菌を接種したブナ実生の胚軸接種部におけるカテキンの集積

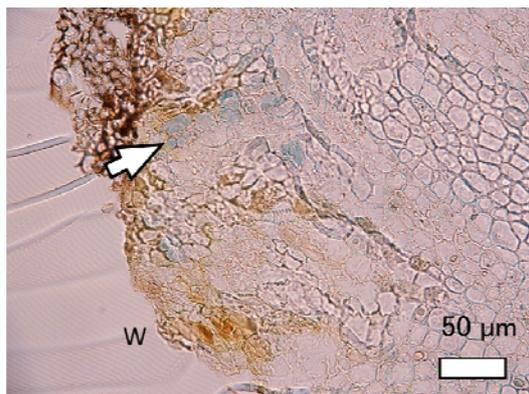


図2 強光下で病原菌を接種したブナ実生の胚軸接種部におけるカテキン類の集積

W、接種の付傷部、矢印、壊死組織と生残組織の境界部におけるカテキン類の集積部 (DMACA 染色によって、カテキン類が青く染色されている)

強光区の接種部の横断面には、接種に伴う壊死組織と生残組織の境界に周皮の形成は認められなかったが、カテキン類が接種部の生残組織最外層の柔細胞内に集積した(図2)。強光区の対照では、菌接種時のような壊死組織は形成されず、付傷処理部の近傍の柔細胞にカテキン類の集積が認められた。弱光区では染色された細胞はほとんど認められず、カテキン類の集積は認められなかった。

付傷接種の結果、強光区では周皮形成が認められずカテキン類の集積で枯死を免れたことから、カテキンとエピカテキンが立枯病菌の侵入に対する動的な防御の一要因として機能することが示唆された。

野外で光環境と実生のカテキン濃度の相関が低かったことから病原菌が感染する以前の段階では、静的防御機能としてカテキン類の寄与は低い可能性が示唆されるのに対し、菌の感染に伴う動的防御機能としてはカテキン類の寄与が大きいと考えられ、興味深い。

この成果は、森林生態系の個体群生態を理解するための新たな着眼点を提供することができ、今後様々な樹種の研究に応用されることが期待されることから、本成果などを基に、日本生態学会第59回大会(平成24年3月、大津市、日本生態学会会員対象)において自由集会「化学物質で植物と微生物の相互作用を探る—野外生態研究における事例—」を開催した。

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4件)

①Yamaji Keiko, Ichihara Yu, The role of catechin and epicatechin in chemical defense against damping-off fungi of current-year *Fagus crenata* seedlings in natural forest, *Forest Pathology*, 査読有、42巻、2012、1-7

DOI: 10.1111/j.1439-0329.2010.00709.x

②Hirooka Yuuri, Ichihara Yu, Masuya Hayato, Kubono Takanori, Seed Rot, a New Disease of Beech Tree Caused by *Neonectria ramulariae* (anamorph: *Cylindrocarpon obtusiusculum*), *Journal of Phytopathology*, 査読有、160巻、2012、504-506

DOI:10.1111/j.1439-0434.2012.01934.x.

③市原優、ブナやコナラの天然更新と菌害、

みどりの東北、査読無、102 巻、2012、4

- ④市原優、山路恵子、明るい場所で育つブナの芽生えはなぜ病気に強い？、季刊森林総研、査読無、2011 年、13 巻、12-13

〔学会発表〕（計 2 件）

- ①市原優、山路恵子、ブナ実生の立枯病菌接種による防御物質の変動、東北森林科学会講演要旨集 17、2012 年 8 月 22 日、秋田県生涯学習センター（秋田市）
- ②市原優、升屋勇人、窪野高德、ブナ堅果腐敗の林床における分布、日本森林学会大会学術講演集 123、2012 年 3 月 27 日、宇都宮大学（宇都宮市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 優 (ICHIHARA YU)
独立行政法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員
研究者番号：1 0 3 5 3 5 8 3

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

杉田 久志 (SUGITA HISASHI)
独立行政法人森林総合研究所・森林植生研究領域・室長
研究者番号：6 0 1 5 4 4 7 3