

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23780190

研究課題名(和文) マツ枯れの急激な樹体内水分消失に対する気孔および木部生細胞の反応特性の解明

研究課題名(英文) Responses of stomata and xylem parenchyma cells to abrupt water disappearance in xylem of saplings infected with pine wilt disease

研究代表者

矢崎 健一 (Yazaki, Kenichi)

独立行政法人森林総合研究所・植物生態研究領域・主任研究員

研究者番号：30353890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マツ材線虫病による枯死要因の解明のため、マツノザイセンチュウを接種したクロマツ苗木の針葉の生理特性と木部の水分状態変化を調べた。仮道管内の水分挙動と生細胞の状態との関連性をcryo-SEMを用いて調べた。接種木では日数とともに気孔が閉鎖し、木部通水阻害が樹脂道を起点に発生した。針葉の水ポテンシャル( )は褐変する直前まで高いままであった。木部柔細胞の変成と仮道管水分挙動との関係は認められなかった。灌水停止した非接種木では、が低下しつつ木部に水が保たれており、再灌水で生理機能が回復した。以上より、マツ材線虫病の樹脂道付近の水分消失は気孔閉鎖などで抑制することはできず、乾燥耐性が失われるといえる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the physiological mechanism of a tree death caused by pine wilt disease, the relationship between the physiological traits of needles and the hydraulic traits of xylem in the saplings of *Pinus thumbergii* inoculated with pine wood nematodes was investigated. Water dynamics in tracheids was also investigated by using cryo-SEM to examine the status of parenchyma cells. Inoculated saplings decreased in stomatal conductance with their embolisms occurred from the surrounding cells of resin canals, but maintained high daily water potential ( ) until the disease symptom was visible. No relationship between water dynamics of tracheids and the deterioration of adjacent parenchyma cells was observed. Controlled saplings under ceased irrigation conserved water in tracheids despite their decreasing in , and they showed recovery of gas exchanges by re-irrigation. In conclusion, abnormal embolism would not be avoided by the stomatal closure and obstruct drought resistance of pine saplings.

研究分野：樹木生理

キーワード：松枯れ cryo-SEM 木部柔細胞 vulnerability curve 水ポテンシャル 光合成 透水係数

1. 研究開始当初の背景

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*、以下線虫) の侵入によるマツ材線虫病発生メカニズムの解明は、従来より我が国の森林保全における重要な課題である。実験的な線虫接種によるマツ樹体の反応が多く調べられており、線虫による個体枯死の原因は、樹幹木部仮道管内の水分が急速に失われ、通水阻害を起こすためであることがわかっている。

樹体内の水は気孔からの蒸散を駆動力として上昇するが、健全木の場合、水不足時には気孔が閉じ、樹体から水分が失われないよう反応する。一方でマツ枯れ進行木においては、灌水をしても木部内の水分が急速に失われる。従って、マツ枯れ罹病による水欠乏ストレスに対して、葉が応答していない可能性がある。しかしながら、マツ枯れの進行に伴い気孔反応や葉の水ポテンシャルがどのように変化しているのか、詳細は不明である。

マツ材線虫病が進行すると、罹病木の樹幹木部細胞から急激に水が失われる。乾燥が進行する際の水分消失のパターンと比較すると、極めて特徴的である。この要因として、線虫が樹脂道周辺のエピセリウム細胞を食害しながら移動し、次第に木部柔細胞が変性することが示唆されている。すなわち、線虫侵入による組織構造の変化、つまり皮層や柔細胞の変性が、水分の消失を引き起こしている可能性が示唆されている。しかしながら、マツ材線虫病進行下における、木部生細胞の変性と木部内水分消失との直接的な因果関係は未だ示されていない。

2. 研究の目的

本研究では、マツ材線虫病進行の各過程において、気孔反応、光合成、水ポテンシャルといった葉の生理機能と木部通水性(木部内の水の通りやすさ)の変化を評価する。また、低温走査型電子顕微鏡(cryo-SEM)を用いて、病状の進行過程における木部水分分布を観察し、また観察箇所から試料を切り出して生細胞の状態を光学顕微鏡で観察する。これら組織学的、生理学的手法を組み合わせ、気孔反応特性と樹幹の水分状態とを対応させ、通水阻害に及ぼす周辺細胞の状態の影響を評価し、「マツ材線虫病における爆発的な通水阻害発達プロセスおよび発生メカニズム」を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 供試木

供試木として、クロマツ (*Pinus thunbergii*) 2年生苗木を用いた。森林総合研究所の実験苗畑に植栽されたクロマツ苗木を、2012年および2013年のそれぞれの春先に鹿沼土と赤玉を1:1で混合した5リットルポットに植栽した。いずれの年も、処理開始

まで2日に1回、十分に灌水した。

(2) 実験処理

①線虫接種処理および線虫接種と乾燥との混合処理

2012年5月に供試木を森林総合研究所内の自然光利用型生育環境制御室に搬入し、温度28/23度(昼/夜)、湿度60/70%(昼/夜)で生育した(湿潤(W)条件)。供試木のうち半数は一ヶ月間、灌水を1週間に一回程度に抑制、生育環境湿度を40/50%(昼/夜)に制御した(乾燥(D)条件)。7月下旬に樹幹地際部にメスで切り込みを入れ、強病原性のマツノザイセンチュウ懸濁液(10,000頭/100 $\mu$ l)を接種、パラフィルムで封入した(W+PWNおよびD+PWN処理)。コントロールとしてW処理とD処理それぞれ、3個体に蒸留水のみを接種した。W+PWN処理個体のうち、半数を引き続き湿潤条件で、残り半数を乾燥条件においた。D+PWN処理は引き続き乾燥条件で生育させた。

	水分条件 (接種前)	接種	水分条件
W	灌水 (/2日)	なし	(初期値のみ)
W+PWN	灌水 (/2日)	あり	灌水 (回/2日)
D	灌水 (/週)	なし	(初期値のみ)
D+PWN	灌水 (/週)	あり	灌水 (/週)

表1 接種実験処理

②非接種クロマツ苗木の乾燥への反応特性

2013年5月に供試木を2012年と同様に自然光利用型生育環境制御室に搬入し、湿潤条件で処理まで生育させた。同年7月下旬より灌水を停止し、各種生理特性を経時的に測定した。また、水ポテンシャルがP50(後述)になった付近で再灌水し、その反応をみた。

(3) 葉の生理特性の評価

①水ポテンシャル

夜明け前および日中の一年葉の水ポテンシャルを経時的にプレッシャーチャンバー(Model 600, PMS Instrument Company, USA)で測定した。

②気孔反応およびガス交換機能の測定

+PWN処理において、日中における一年葉の気孔コンダクタンスを、ポロメータ(LI-1600, Li-Cor, USA)で経時的に測定した。また、処理直後(コントロール)および発症時(+PWN処理)の一年葉において、携帯型ガス交換測定装置(LI-6400, Li-Cor, USA)を用いて、A/Ci曲線(CO<sub>2</sub>濃度に対する光合成速度変化)を作成し、最大光合成速度および最大炭酸固定速度(V<sub>cmax25</sub>)を測定した。測定用のチャンバーは広葉樹用のものを用いた。葉はヘアピンを用いて隙間なく並走してチャンバーにセットし測定を行った。測定後に針葉を採取、投影面積を求め、測定値を換算した。接種後、10日程度で葉の褐変がみられたが、測定は見かけ上、健全な葉で行った。また10日程度の

葉の加齢の光合成活性への効果は無視できるとみなし、接種時における測定値を非接種のコントロールとみなした。

#### (4) 木部の通水特性の評価

ガス交換機能を測定した個体の通水状態を評価するため、測定部位近辺の一年生の枝を採取し、透水係数を測定した。測定対象を溶液で満たしたチューブに接続して圧力勾配を発生させ、単位時間あたり流れる溶液の量をコンピュータに接続した電子天秤で計測した。測定溶液は 20mM KCl を濾過、脱気したものを用いた。測定するための圧力は真空チャンバーで発生させた。採取した枝の両端を水中で鋭い剃刀を用いて切断面を平滑にし、透水係数測定システムのシリコンチューブに接続した。測定圧 10kPa で流量を計測した。計測終了後、枝の辺材部面積を USB マイクロスコープで撮影した断面画像より求めた。以下の式を用いて、辺材面積あたりの透水係数 (Ks) を求めた。

$$K_s \text{ (kg m}^{-1} \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}) = \text{単位時間あたり透過流量 (kg s}^{-1}) \cdot \text{試料長 (m)} / (\text{測定圧 (MPa)} \cdot \text{辺材面積 (m}^2))$$

#### (5) 木部内水分挙動と木部柔細胞の観察

ガス交換、透水係数測定終了後に個体にビニル袋をかけて暗所に置き、葉と木部との水ポテンシャル勾配を安定させた。その後、液体窒素で主軸地際部付近を凍結させ、素早く採取して、-80 度のディープフリーザで保管した。凍結試料の木口面を凍結ミクロトームで平滑にした。線虫を接種したサンプルにおいては、切削終了時に 20 $\mu$ m 厚の切片を二枚、-20 度以下に冷却したクライオフィルムで採取し、柔細胞内容物の観察に用いた。凍結試料は cryo-SEM (JSM-6510、日本電子) で観察した。凍結試料から採取した切片に DAPI 染色を行い、UV 励起して蛍光顕微鏡で観察した。

#### (6) クロマツ苗木の木部の脆弱性

クロマツ苗木の木部通水機能の乾燥への脆弱性を評価するため、系にかかる負圧と透水係数損失率 (PLC) との関係である脆弱性曲線 (vulnerability curve) を作成した。試料は水ストレスを受けていない個体より採取した。遠心分離機 (特注、久保田商事) を用いて、14cm 長に切断した一年生枝に人工的にある張力を発生させ、その直簿に透水係数を測定し、PLC を求めた。PLC と水ポテンシャルとの関係をロジスティック曲線で回帰して得られた vulnerability curve より、通水機能を 50% 失う水ポテンシャル (P50) を求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 病兆の進行

+PWN 処理木において、接種後約 10 日目から一年葉が褐変するのが観察された (図 1)。前処理および水分条件に関わらず、ほぼ同時に発生したが、W+PWN 処理にくらべ D+PWN で進

行が速い傾向がみられた。



図 1. 接種10日目の処理木

#### (2) 木部の脆弱性

水ストレスを受けていない一年生枝木部の P50 は -2.8MPa であった (図 2)。従って乾燥実験における灌水停止の目安として、水ポテンシャルが -3.0 付近まで低下するまで、と設定した。

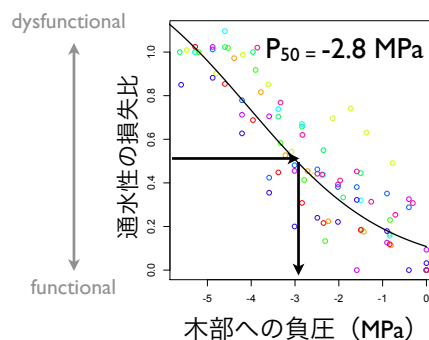


図 2. 脆弱性曲線 (vulnerability curve)

#### (3) 気孔反応、水ポテンシャルおよび通水特性の経時変化

接種直後より気孔コンダクタンス (図 3) および Ks (図 4) は日数とともに低下する傾向にあった。一方で日中の水ポテンシャル (図 5) は漸減した後、葉が褐変する付近において急に低下した。いずれも D+PWN 処理で傾向が顕著であった。

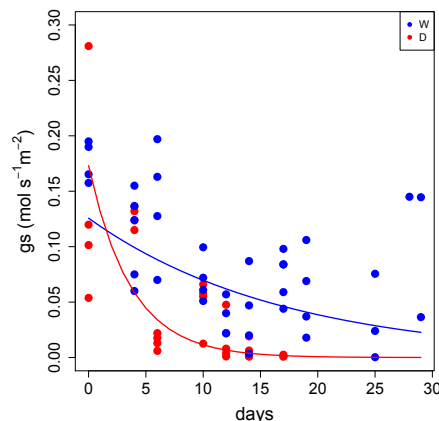


図 3. 接種木の気孔コンダクタンスの推移

乾燥実験においては、水ポテンシャル (図 5) および気孔コンダクタンス (LI-6400 で

の測定値) が灌水停止日数に応じて直線的に低下した。これらは再灌水によって乾燥前の状態まで回復した。一方、Ks は比較的緩やかな低下であった (図 4)。

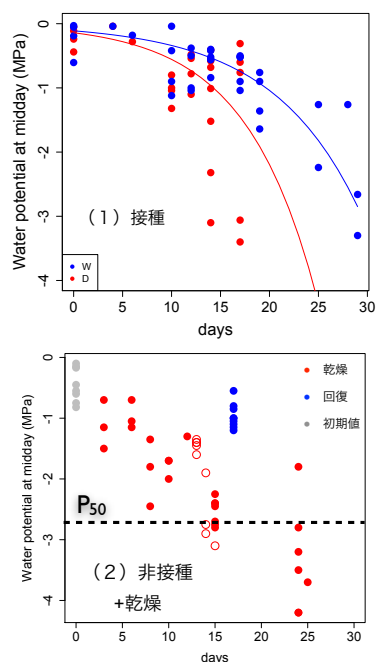


図 4. (1) 接種木および (2) 非接種木 + 灌水停止処理の1年葉の日中の水ポテンシャルの推移

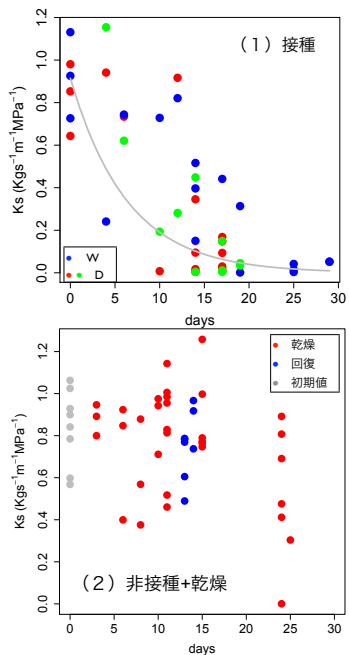


図 5. (1) 接種木および (2) 非接種木 + 灌水停止処理の1年葉の日中の比透水係数の推移

#### (4) 光合成機能への影響

生育時の光合成速度は D 処理で低下していたが、これは気孔の閉鎖に伴うものであった。最大光合成速度および V<sub>cmax</sub> は +PWN でより低かった (図 6)。乾燥実験においては水ポテンシャルの低下に伴って V<sub>cmax</sub> が低下したが、灌水により処理前まで回復した (図 7)。

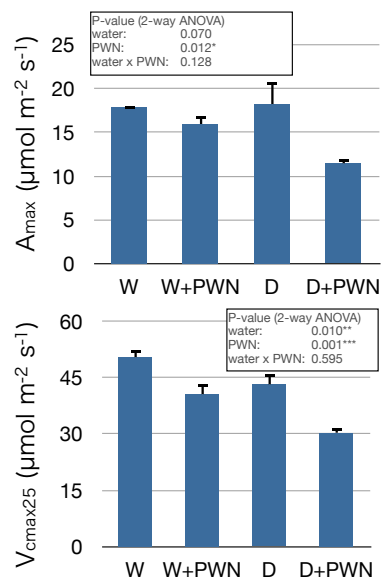


図 6. 接種木の針葉褐変直前の最大光合成速度 (A<sub>max</sub>) および最大炭酸固定効率 (V<sub>cmax25</sub>)

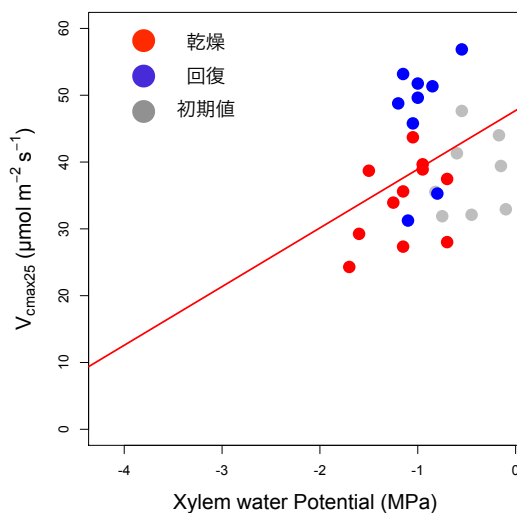


図 7. 非接種木 + 乾燥処理の最大炭酸固定効率 (V<sub>cmax25</sub>) と水ポテンシャルとの関係

#### (5) 木部内水分挙動と木部生細胞

一年葉の褐変が観察され始めた時点 (12 日後) で、前年形成木部の樹脂道近傍を中心に水が消失していた (図 8)。木部柔細胞との対応は明確ではなく、水が消失している細胞の付近においても核が観察された (図 8)。周辺の水分が消失している樹脂道の多くにチロソイドが観察された (図 8)。さらに、水ポテンシャルがまだ低下していない個体においても、木部内で既に爆発的にエンボリズムが拡大していた様子が観察された。乾燥実験においてはエンボリズムが確認されず、-3MPa 以下まで葉の水ポテンシャルが低下した個体においても仮道管内こうに水が充填されていた (図 9)。

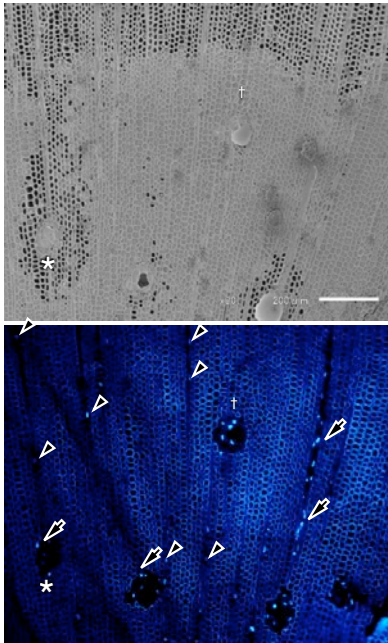


図8. 接種12日目の木部内水分状態（上）と同じ部位の柔細胞の核の様子（下）  
同じ部位をマークで示した。矢頭は柔細胞の核を示す。スケールバーは100 $\mu$ m。

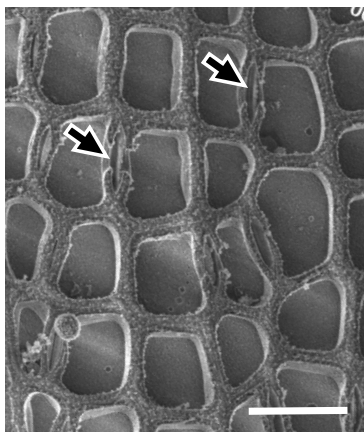


図9. 非接種+乾燥処理の木部内水分  
水ポテンシャルは-3.2MPa。スケールバーは20 $\mu$ m。  
矢印は閉鎖した壁孔を示す。

#### (6) 考察

+PWN 個体で、気孔が接種直後より閉鎖し、水ポテンシャルは急激には低下しなかった。このことより、マツ材線虫病罹病木は感染初期で葉において水ストレスが起きていなかったことが示唆される。一方で透水係数は接種直後より漸減傾向にあった。葉の褐変した個体で木部のエンボリズムが発生していたが、まだ水ポテンシャルが低下していない個体においても、木部エンボリズムが発生していた。木部内の水ポテンシャルは測定していないが、脆弱性曲線（図2）より、この状態における木部にかかっている張力は-2.8MPaを下回っていると推測される。従って、マツ材線虫病では葉へ給水するための水ポテンシャル勾配が発生していなかった可能性が示唆される。

+PWN では、水分処理間において  $K_s$  の変化

に大きな差異は認められなかった。クロマツの木部通水系に乾燥の影響が出るより先に松枯れ病によるエンボリズムが広がったといえる。この葉への通水系が機能しなくなっていることで、水分条件に関わらず、葉の褐色が一気に進行すると思われる。

最大光合成および  $V_{cmax25}$  がマツ材線虫病罹病木で低下していたことは、光合成の炭酸固定機能に松枯れ病がなんらかの影響を及ぼすことを示唆している。先行研究において、マツ材線虫病による光合成活性の低下は水ポテンシャルの低下によるものと考察されてきた。本研究の結果は、気孔閉鎖による光合成活性の低下のみでなく、光合成機能そのものにマツ材線虫病が影響を及ぼし得ることを示唆している。

木部生細胞の核の残存と隣接する仮道管内この水分状態とは十分対応しておらず、柔細胞の生死が水分維持に関与するという十分な証拠は得られなかった。生細胞の維持に水分は必須であること、柔細胞が隣接する仮道管とは壁孔で連絡していること、心材化と木部の含水率低下が対応することから、仮道管の状態が木部柔細胞の生死を規定していることは推測される。本研究では柔細胞の核の有無のみで確認を行ったが、今後は木部柔細胞の細胞質の状態や、浸透調節物質の状態を評価する必要がある。

乾燥進行下においてもクロマツはある程度樹体内に水分を保持する機構があるといえる。一方、マツ材線虫病罹病木においては、通常の水ストレス環境下では起こりえない、樹脂道近傍からの水分消失と、葉と木部との水ポテンシャル勾配の損失により、マツの針葉が一気に枯死すると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計4件）

(1) 矢崎 健一、大曾根 陽子、丸田 恵美子、種子田 春彦、大塚 晃弘、佐々木 駿、小笠 真由美、飛田 博順、北尾 光俊. 乾燥からの回復におけるクロマツ苗木の水ポテンシャル変化と木部内水分挙動. 日本森林学会大会（2015年3月28日、北海道大学）

(2) 矢崎 健一、大曾根陽子、小松 雅史、飛田 博順、北尾 光俊. 乾燥ストレスおよび回復時におけるクロマツ苗木の光合成および水分特性. 日本森林学会大会（2014年3月29日、埼玉県大宮市）

(3) 矢崎 健一、小松 雅史、神崎 菜摘、高梨 琢磨、飛田 博順、北尾 光俊. マツ材線虫病に罹病したクロマツ苗木の木部内水分挙動と木部生細胞の同所的観察. 日本木材学会大会（2014年3月14日、愛媛大学）

(4) 矢崎 健一、小松 雅史、神崎 菜摘、高梨 琢磨、内海 泰弘、石田 厚、北尾 光俊. 乾燥下でマツノザイセンチュウに感染したクロマツ苗木の水利用および光合成特性の関係. 日本森林学会大会（2013年3月26日、岩手大学）

〔その他〕

(1) 矢崎 健一. 松枯れの進行に伴う木部内水分挙動と葉の生理特性. 京大大学生態学研究センターセミナー (2015年1月16日、京都大学)

(2) 矢崎 健一. 木部の通水機能と葉の生理特性. 日本木材学会組織と材質研究会秋季シンポジウム(招待講演)(2013年9月29日、北海道大学)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢崎 健一 (YAZAKI KENICHI)  
森林総合研究所・植物生態研究領域・主任研究員  
研究者番号：30353890

### (2) 研究協力者

高梨 琢磨 (TAKANASHI TAKUMA)  
森林総合研究所・森林昆虫研究領域・主任研究員  
研究者番号：60399376

神崎 菜摘 (KANZAKI NATSUMI)  
森林総合研究所・森林微生物研究領域・主任研究員  
研究者番号：70435585