

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18681006

研究課題名 (和文) 根の生理指標を用いた土壌酸性化に対する樹木への影響評価

研究課題名 (英文) Evaluation of the effects of soil acidification on forest trees using physiological root indicators

研究代表者

平野 恭弘 (HIRANO YASUHIRO)

独立行政法人森林総合研究所・関西支所・主任研究員

研究者番号：60353827

研究成果の概要：

土壌酸性化の樹木への影響を、根の生理指標を用いて評価する方法を確立するために、樹木への影響要因であるアルミニウムが、根の生理指標の一つカロース（多糖類の一種）蓄積量に与える影響を調べた。スギでは、他の樹種と異なった根端のアルミニウム蓄積特性により、過剰アルミニウム環境下で根端にカロースが蓄積されにくいことが明らかとなった。スギ根のカロース蓄積量は土壌酸性化に対する根の指標として有効でない可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	6,000,000	1,800,000	7,800,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：酸性化・森林・樹木根・環境指標・アルミニウム・細根・カロース

## 1. 研究開始当初の背景

近年、東アジアにおける酸性降下物質等の増大が予想され、この地域の森林生態系に与える影響が懸念されている。とくにわが国の中部・関西地域では、過去に火山灰降下の影響が少ないために土壌の酸緩衝能が低く、酸性化の影響を最も受けやすい森林土壌が広がっている。したがって、この地域の森林を将来にわたり健全に保つためには、酸性化の影響を受けやすい土壌に生育する樹木が、実際に影響を受けているか否かを早期に検出し評価する必要がある。

土壌酸性化が樹木に与える影響について

は、主に葉など地上部のバイオマス、光合成速度、養分動態などに注目した研究が多く行われてきたものの、樹木の根の生理過程への影響は、草本作物などに比べて国内外ともに立ち遅れているのが現状である。

樹木の根の生理指標は、様々な環境変動下において感受性が高く、成長を支える養水分吸収に重要な役割を果たすため、樹木の成長状態を早期に評価する際に役立つ。根に蓄積される多糖類の一種カロースは、欧州の樹種において、土壌酸性化に対する感度、特異性が高く、樹木の生理指標となることが明らかにされている。根のカロース蓄積量は、酸性

度が強くなるに従い多くなり、一般的にカロース量が多いほど根の成長が抑制される。しかしながらわが国の樹種について、根のカロース蓄積特性やその生理指標としての有用性は未だ明らかにされていない。土壤酸性化の樹木への影響は、酸性度の直接的影響よりも土壤酸性化に伴い溶出する植物に有害なアルミニウムの影響が大きい。そこで本研究では土壤酸性化の影響の中でも主にアルミニウムの影響について着目した。

## 2. 研究の目的

本研究では、根の生理指標を利用した土壤酸性化の樹木への影響手法を確立し、この評価方法を用いて酸性化の影響を受けやすい森林土壤に生育する樹木への影響を評価することを目的として、具体的には以下の2点について解明を目指した。

- (1) わが国の主要樹種であるスギなどについて、根の生理指標であるカロースに着目し、酸性物質等の閾値濃度、蓄積部位など根端のカロース蓄積特性を解明する。
- (2) 根のカロース量や呼吸活性などを生理指標として、中部・関西地域に広がる酸性化を受けやすい土壤に生育するスギへの土壤酸性化の影響を定量的に評価する。

## 3. 研究の方法

- (1) スギ苗・クロマツ苗の根端カロース蓄積特性

### ①根端カロース形成量

スギ(*Cryptomeria japonica*)の根端カロース形成特性を明らかにするために、水耕栽培を用いてアルミニウム添加実験を森林総合研究所関西支所の温室でおこなった。

スギ苗には2ヶ月生の実生苗を用いた。水耕溶液には、野外の森林土壤溶液の養分濃度を参考にした Jentschke et al. (1999)の5倍溶液(pH 4.0)を用いた。4段階のアルミニウム濃度(0, 50, 500, 5000  $\mu\text{M}$ )を添加した培養溶液を用いて、処理区あたり1/5000アールのワグネルポット3ポット、1ポットあたり10本のスギ苗に24時間処理を行った。処理終了後、各実生10mmの根端を10本程度切断し96%エタノール内に保存し、根端カロース形成量測定用試料とした。残りの根の部分を用いて、呼吸に関連するコハク酸脱水素酵素活性(TTC還元活性)を Richer et al. (2007)の方法を用いて測定した。

またスギ苗とクロマツ(*Pinus thunbergii*)苗の根端カロース形成能力を明らかにするために、培養液にカロースエリクターとして20  $\mu\text{M}$  ジキトニンを添加した処理区、1000  $\mu\text{M}$  アルミニウムを添加した処理区、何も添加しない対照区の3処理区を設定した実験も行った。

た。スギ苗には2ヶ月生実生苗、クロマツ苗には1ヶ月生実生苗を用いた。これらも同様に24時間の処理を行った。

処理終了後、各実生10mmの根端を10本程度切断し96%エタノールに保存し、カロース形成量測定用試料とした。また一部の根端はカロース分布観察用に70%エタノールに保存した。

根端カロースの測定は、Hirano et al. (2004)にしたがって、以下の通り行った。根端試料新鮮重量20mgを2.0mLのプラスチックチューブに測り取り、20%のエタノール内で粉碎した。遠心後、上澄みのエタノールを捨て、さらに2回同じ洗浄作業を繰り返した。1mL NaOHをチューブ内に加えよく攪拌した後、80°Cで30分カロースを抽出した。15分間遠心後、上澄み液を採取した。0.2mLの上澄み液と0.4mLの0.1%アニリンブルー、0.21mLの1M HClと0.59mLの1M NaOHを加え、50°Cで20分培養し30分間室温で静置した。蛍光分光光度計をもちいて励起波長393nm、蛍光波長494nmで蛍光強度を測定した。標準物質にはカードランを用い、根の新鮮重量あたりのカードラン等量でカロース量を表した。それぞれのサンプルでアニリンブルーを加えないときの蛍光強度も測定しその値を差し引いた。

### ②根端カロース分布特性

スギ苗およびクロマツ苗の根端カロースの分布特性を明らかにするために、①で得られたスギ苗とクロマツ苗の根端試料を用いて、蛍光顕微鏡による観察を行った。

根端の横断面切片観察のために70%エタノールに固定した根端試料をパラフィルムで巻きハンドセクションで両刃剃刀を用いて切片を作成した。また縦断面観察のために、根端から0.5cmまでの根試料を凍結マイクロームに固定し縦断面試料を作成した。これらの切片を0.1%アニリンブルー1Mグリシン溶液(pH 9.5)にて15分間染色し脱イオン水で洗浄後、観察用プレパラートを作成した。プレパラート上の根端切片を蛍光顕微鏡(OLYMPUS BX-FLA)を用いて観察した。

### ③根端アルミニウム分布特性

スギ苗とクロマツ苗の根端におけるアルミニウムの集積分布特性を明らかにするために、エネルギー分散型X線解析装置付走査型電子顕微鏡(SEM EDX)による観察を行った。

2ヶ月生スギ苗と1ヶ月生クロマツ苗を、0.2mM  $\text{CaCl}_2$ 溶液(pH 4.0)で24時間水耕栽培した後、1mMのアルミニウム溶液で処理する区と対照区を設定した。各処理区3ポットずつ1ポットあたり4本ずつの苗を供試した。24時間の処理後、根端約1cmを切断し、液体窒素で凍結した。

凍結した根端試料を根端から 0.5 cm 以内の横断面に切断後、クロム蒸着を行い根端横断面のアルミニウムの集積状況を、表皮細胞、皮層細胞、中心柱ごとに SEM EDX を用いてアルミニウム分布様式を解析した。

## (2) 関西地域の酸緩衝能の異なる森林土壌で植栽されたスギ苗の反応

「酸性雨等森林被害モニタリング事業（第一期）」（林野庁 1997）において、土壌の塩基量と交換酸度（アルミニウム量）から酸緩衝能の高い（酸性化影響を受けにくい）土壌または酸緩衝能の低い（酸性化影響を受けやすい）土壌に分類されている適潤性褐色森林土のスギ林分（Takahashi et al. 2001）を関西地域（滋賀県、京都府、兵庫県）から各 4 林分ずつ選定した。合計 8 ヶ所のスギ林分から、直径 5cm 深さ 20cm の土壌円筒を各林分 10 本ずつプラスチック円筒に採取した。土壌構造が維持されたままのプラスチック円筒に、2 ヶ月生スギ実生苗を各 2 本ずつ移植し合計 160 本のスギ実生苗（異なる酸緩衝能土壌 2 × スギ林 4 林分 × 土壌円筒 10 本 × スギ実生 2 本/円筒）を森林総合研究所関西支所の温室内で育成した。移植 3 ヶ月後にすべての実生苗を掘り取り、苗高および根長成長、根直径や比根長（SRL: m/g）、根の呼吸速度などを測定した。

## 4. 研究成果

### (1) スギ苗・クロマツ苗の根端カロース蓄積特性

#### ①根端カロース形成量

アルミニウムで 24 時間処理したスギ苗の根端カロース蓄積量について、アルミニウム溶液処理区と対照区との間に有意差は認められなかった（図 1A）。また根の呼吸活性（TTC 還元量）についても、アルミニウム処理区と対照区との間に有意差は認められなかった。さらに 5000  $\mu\text{M}$  のアルミニウム溶液を 7 日間処理しても同様に対照区との間に有意差は認められなかった。スギ苗の根端にカロース形成能力があるか否かを明らかにするために、ジキトニン処理を 24 時間行ったところ、対照区に比べて有意に多くカロースの蓄積が認められた（図 1B）。

一方でクロマツ苗に 1 mM のアルミニウム溶液を 24 時間処理したところ、対照区に比べて有意に多くカロースが蓄積された。さらにクロマツ根端のカロース形成能力を明らかにするために、ジキトニン処理を 24 時間行ったところ、対照区に比べて有意に多くカロース蓄積が認められた。（図 1C）

本実験結果から、スギの根はカロース形成能力は保持しているものの、アルミニウムの処理によって新たなカロース蓄積は認めら

れないことが明らかとなった。一方でクロマツはカロース形成能力も保持し、アルミニウムの処理で根端にカロースが形成された。ドイツウヒ、ポプラ、ヨーロッパナなどでは、クロマツ根端と同様に、アルミニウム溶液処理により、カロースが有意に蓄積されることが明らかになっている。この特性から土壌酸性化すなわちアルミニウム毒性に対する根の指標としての有効性が示唆されている。しかしながら、わが国の主要造林樹種であるスギでは、アルミニウム処理により根端にカロースが新たに蓄積されないことから、土壌酸性化に対する根の指標として有効でない可能性が示唆された。

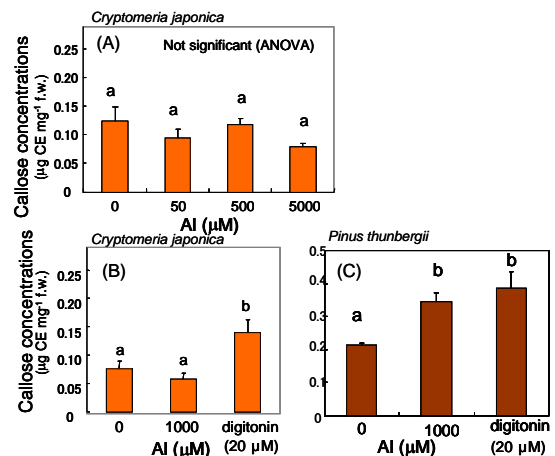


図-1. アルミニウム溶液処理されたスギ苗 (A) とジキトニン溶液処理されたスギ苗 (B) とクロマツ苗 (C) の根端カロース蓄積量

#### ②根端カロース分布特性

アルミニウム溶液またはカロースエリシターのジキトニン溶液を用いた 24 時間処理後の根端のカロース分布特性について、クロマツ根端の横断面を観察したところ、主に皮層細胞の細胞壁にカロースが形成されることが明らかとなった。カロースエリシターであるジキトニンで処理したクロマツ根端ではとくにその傾向が強く、アルミニウム処理したクロマツ根端でも同様の傾向が認められた（図 2B）。

一方でスギ根端の横断面を観察したところ、カロースエリシターで処理したスギ根端では、主に表皮細胞の細胞壁でカロースが蓄積する傾向が認められた。対照区とアルミニウム処理区のスギ根端では、表皮細胞と内皮細胞に自家蛍光が観察され、カロースエリシターで処理した根端のように表皮細胞の強い蛍光強度は認められなかった（図 2A）。とくにスギではクロマツに比べてどの処理区でも内皮細胞に強い自家蛍光が観察された。

本結果から、スギ根端の内皮細胞に強く、

さらに表皮細胞では弱いものの認められる自家蛍光がカロースの定量を阻害している可能性が示唆された。またカロースエリクターで処理したスギ根端では表皮細胞にカロース形成が観察された。このことはスギとクロマツで根端カロースの形成部位が異なること、すなわちスギでは表皮細胞の細胞壁にクロマツでは皮層細胞の細胞壁にカロースが形成され蓄積される傾向にあることが示唆された。これらのカロース分布特性の違いは、クロマツとスギ根端の内皮細胞など根の構造の違いにより影響されていることが示唆される。

これらのカロース分布様式に関する結果は、スギ根端に形成されるカロース蓄積量が土壌酸性化に対する樹木根の生理指標として有効でないことを支持するものである。一方でクロマツ根端のカロース蓄積および分布様式は、これまでに報告されているドイツトウヒの根端などと同じ特性であり、クロマツでは根端カロース蓄積量が酸性化に対する指標として有効である可能性が高い。

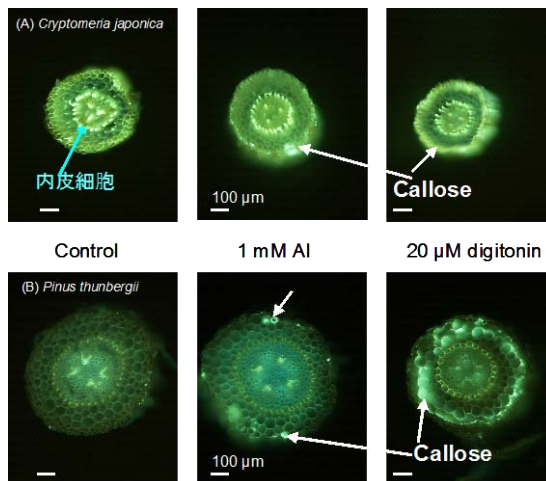


図-2. スギ(A)とクロマツ(B)苗の根端横断面におけるカロース分布特性.

表皮細胞や皮層細胞で強い蛍光が観察されている明るい黄緑色の部分がカロース。

### ③根端アルミニウム分布特性

アルミニウム溶液(1 mM)で24時間処理後のスギ苗とクロマツ苗根端におけるアルミニウム蓄積特性を明らかにするために、SEM-EDXによる観察を行ったところ、クロマツでは、アルミニウムの多くが表皮細胞に蓄積されるものの、皮層細胞や中心柱に至るまで蓄積される傾向にあった(図3B)。対照的にスギでは主に表皮細胞に蓄積され、皮層細胞や中心柱ではアルミニウムの蓄積がほとんど認められなかった(図3A)。

このような根端におけるアルミニウムが

スギでは表皮細胞にクロマツでは表皮細胞と皮層細胞に蓄積されるという特性は、スギでは表皮細胞にクロマツでは皮層細胞にまでカロースが分布しているという点で類似した。

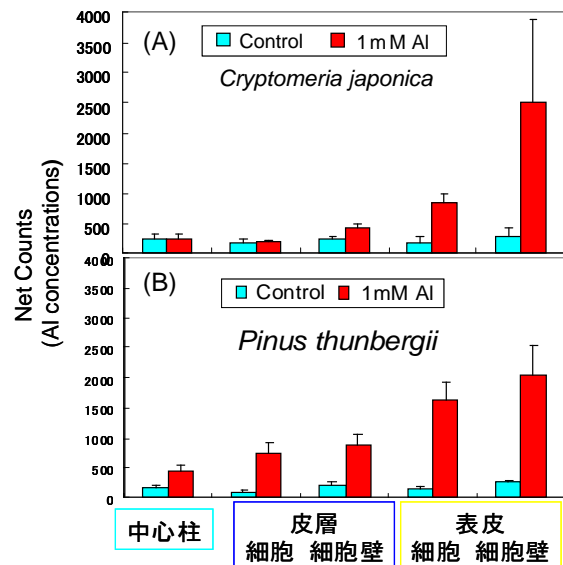


図-3. アルミニウム溶液で一日処理したスギおよびクロマツ根端のアルミニウム分布特性.

したがって、アルミニウムの根端への集積様式がカロースの形成および蓄積の特性に影響していることが示唆された。

以上の結果から、スギ根端のカロース蓄積量は、土壌酸性化すなわちアルミニウムの樹木への影響評価を行う生理指標としては有効でないことが示唆された。

アルミニウム処理されたスギでは、根端にアルミニウムの集積が認められること、さらにこれまでの報告でアルミニウム環境下では根端のカルシウム濃度の低下が起きることなどから、土壌酸性化に対するスギの根の指標としては、多くの樹種で有効性が示唆されている根のカルシウム/アルミニウムモル濃度比が候補として挙げられる。

### (2) 関西地域の酸緩衝能の異なる森林土壌で植栽されたスギ苗の反応

酸緩衝能の高い土壌で生育したスギ実生の3ヶ月間の平均苗高成長量は5 cmで、酸緩衝能の低い土壌ではわずか3 cmであった(図4)。後者のうち、とくに2つの林分については、他の林分よりも有意に成長が小さかった。根長成長でも同様な傾向が認められた。

しかしながら、根の呼吸速度については、苗高および根長成長量の最も低い林分の土



壤で最も低かったものの、その他7林分の土壤については、成長量との間に一定の傾向は認められなかった。根直径や比根長 (SRL : m/g) には、土壤による影響差は認められなかった。

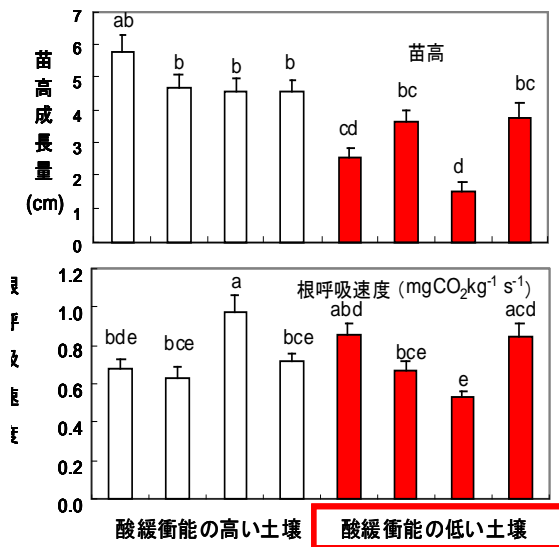


図-4. 異なる酸緩衝能の土壤で育成されたスギ苗の苗木成長と根の呼吸速度。

本研究の結果から、土壤の酸緩衝能の違いは、スギ苗の成長量に影響を与えるものの、根の形態や呼吸には影響が小さいことが示唆された。土壤酸性化のスギ苗への影響評価を行うためには、有効な指標として提案されている根のカルシウム/アルミニウムモル濃度比と土壤の塩基量およびアルミニウム量との関係を調べる必要がある。

#### 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5件)

- ① Hirano Y, Mizoguchi T, Brunner I (2007) Root parameters of forest trees as sensitive indicators of acidifying pollutants -a review of research of Japanese forest trees-. Journal of Forest Research. 12:134-142. DOI: 10.1007/s10310-006-0263-2 査読有.
- ② Vangelova E, Hirano Y, Eldhuset TD, Sas-Paszt L, Bakker MR, Puttsepp U, Brunner I, Lohmus K, Godbold D. (2007) Tree fine root Ca/Al molar ratio -indicator of Al and acidity stress. Plant Biosystems. 141:460-480. DOI:10.1080/11263500701626192 査読有.

- ③ Hirano Y, Noguchi K, Miura S (2007) Development and functions of roots of forest trees in Japan. Journal of Forest Research. 12:75-77. DOI:10.1007/s10310-006-0274-z 査読無

- ④ Qin RJ, Hirano Y, Brunner I (2007) Exudations of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn. Tree Physiology 27: 313-320. DOI: 10.1093/treephys/27.2.313 査読有

- ⑤ Hirano Y, Walthert L, Brunner I (2006) Callose in root apices of European chestnut seedlings: a physiological indicator of aluminum stress. Tree Physiology 26: 431-440. DOI: 10.1093/treephys/26.4.431 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 平野恭弘・牧田直樹・池田智恵・小島永裕・山瀬敬太郎・野崎愛 関西地域の酸緩衝能の異なる土壤で育成されたスギ苗の根系反応. 第120回日本森林学会大会. 2009年3月28日. 京都大学
- ② 平野恭弘 Root parameters of forest trees as sensitive indicators of acidifying pollutants -a review of research of Japanese forest trees-. 第120回日本森林学会大会. 2009年3月26日. 京都大学
- ③ Hirano Y, Beat F, Brunner I Differential responses in aluminium-induced callose formation in roots among tree species. Woody roots and Ecosystem services, COST E38 2008年5月17日. Lisbon, Portugal
- ④ Hirano Y, Brunner I Use of callose formation in roots as an indicator of aluminum stress in forest trees. Fourth International Symposium on Dynamics of Physiological Processes in Roots of Woody Plants 2007年9月18日. Wales Univ. U.K.
- ⑤ 平野恭弘, Richter A, Brunner I アルミニウム環境下におけるヨーロッパナ苗の根端カロス. 第118回日本森林学会大会. 2007年4月2日. 九州大学農

学部

研究者番号：60353827

- ⑥ Hirano Y, Tanikawa T, Mizoguchi T  
Physiological and morphological adaptations of Japanese cedar roots under aluminum stress. Roots, mycorrhizas and their external mycelia in carbon dynamics in forest soil  
2006年9月10日. Rovaniemi, Finland
- ⑦ 平野恭弘 環境ストレスに対する感受性指標としての樹木細根. 第117回日本森林学会大会. 2006年4月3日. 東京農業大学農学部

[図書] (計2件)

- ① Heim A, Hirano Y and Luster J. (2006)  
Organic Acids in Roots and Root Exudates. *In*: Luster J. and Finlay RD (eds) Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research. Birmensdorf, Swiss Federal Research Institute WSL. 294-295.
- ② Hirano Y and Brunner I (2006)  
Callose concentrations in tree roots. *In*: Luster J. and Finlay RD (eds) Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research. Birmensdorf, Swiss Federal Research Institute WSL. 298-299.

[その他] (計2件)

- ① 森林総合研究所ホームページ  
プレスリリース  
わが国における樹木の根の研究成果を特集化～森林の持つ機能を根から解明へ～  
<http://www.ffpri.affrc.go.jp/labs/kouho/Press-release/2007/theroot20070831.html>  
2007年8月31日.
- ② 森林総合研究所ホームページ  
研究最前線  
樹木の根に蓄積されるカロース量によって土壌酸性化が樹木に与えるストレスを評価できる  
<http://www.ffpri.affrc.go.jp/research/seika/18ronbun/18ronbun.html>  
2006年4月20日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 恭弘 (HIRANO YASUHIRO)  
独立行政法人森林総合研究所・関西支所・主任研究員