

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：80122

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580215

研究課題名(和文) 海岸生クロマツにおける水ストレス評価方法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation method for water stress in coastal Japanese black pine.

研究代表者

真坂 一彦 (Masaka, Kazuhiko)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・森林研究本部林業試験場・主査

研究者番号：60414273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではクロマツ苗に、強い水ストレスとして浸水・乾燥処理を与え、それらの葉の蒸散速度や窒素N量、炭素安定同位体比 $\delta^{13}C$ などを無処理の苗木の葉と比較し、クロマツの衰退原因を評価した。乾燥処理した苗の葉の $\delta^{13}C$ は無処理のものと比較して有意に高くなった。これは葉から水分を逃がさないために気孔を閉じていることを意味する。一方、浸水処理した苗の蒸散速度は無処理の苗より大きく、 $\delta^{13}C$ は有意な差が認められなかった。また死亡個体も多くなった。これらの結果から、浸水処理された苗は強い水ストレスを受けているにも関わらず、気孔が開き気味のために蒸散によって葉から水分が失われて衰退することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We compared leaf transpiration rate, leaf nitrogen contents and leaf $\delta^{13}C$ of *Pinus thunbergii* saplings among flooding, drought and control treatment to evaluate the tolerance to strong water stress.

Leaf $\delta^{13}C$ of drought treatment was significantly higher than that of control. It implies that stomata tended to be closed not to lose water from needles. On the other hand, leaf transpiration rate of flooding treatment was significantly higher than that of control, and no significant difference was observed in leaf $\delta^{13}C$. Besides, many saplings died in flooding treatment. Saplings in flooding treatment declined by loss of water due to open stomata, although the saplings suffered strong water stress.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林科学

キーワード：クロマツ 水ストレス 衰退 生理生態 針葉

1. 研究開始当初の背景

海岸に植栽されたクロマツの衰退原因の一つに、立地の滞水・過湿が指摘されている。

一般に、樹木が衰退する原因の一つとして、強度の水ストレスがあげられる。滞水・過湿がもたらす根系の成長不良は、樹体内への吸水を阻害する一方で、光合成をおこなうために気孔を開く必要があるため、樹体内が水分不足に陥り、強い水ストレスが発生することになる。ところがクロマツは、同じように強い水ストレスが発生するはずの乾燥立地には非常に適応的であることも知られている。このような違いがどのように生じているのか、強い水ストレスに対する応答様式の違いから評価する必要がある。

これまで、樹体内における水ストレスの評価方法として、おもにはポロメーターを用いた蒸散量の測定(谷・石田, 2003)やプレッシャー・チャンバーを用いたP-V曲線法(玉泉, 2004)、炭素安定同位体比(^{13}C)(南川・吉岡, 2006)があげられる。しかしこれらの方法はいずれも一面的な応答しか評価しておらず、強い水ストレスを受けていることが理解できても、どのように樹木が衰退・枯死するのかプロセスが不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、日本の海岸林構成種として代表的な針葉樹クロマツを対象に、針葉樹葉のあらたな水ストレス評価方法の検討、ならびにクロマツの水ストレスへの応答様式を明らかにすることを目的とする。

そこで本研究では、水ストレスへの応答が顕著に表れる葉に注目し、クロマツ苗に強制的に浸水処理および乾燥処理を与えて、光合成速度にかかわるとされる葉の窒素含有量(N量)と葉のクロロフィル含有量(Chl a, Chl b)、乾燥耐性の指標とされる ^{13}C 、そして葉からの蒸散速度(気孔蒸散とクチクラ蒸散)を測定し、無処理の苗から得られた値と比較することで、浸水環境および乾燥環境に対するクロマツの生理生態学的応答を評価し、滞水・過湿環境下におけるクロマツの衰退プロセスを検討する。

また併せて、過湿立地によって衰退していると考えられている造成地(Masaka *et al.*, 2010)に植栽されたクロマツについても同様な調査を行い、被害をほとんど受けていない造成地のクロマツと比較する。

3. 研究の方法

(1) クロマツ苗に対する強制的な水ストレス付加試験

今回の研究に先立ち、2010年5月、クロマツ特号苗(2~3年生、樹高約50cm)を30個体、ビニールポット(径30cm×高さ30cm)に移植し、そのうち15個体について浸水処理に、残りの15個体について乾燥処理に供した。浸水処理は、北海道立総合研究機構林業試験場(以下、道総研林試)の構内に深さ

約20cmのプール(縦約4m×横約2m)をつくり、プールが滞水しないように近くを流れる試験場の沢から水中ポンプ(商品名:ポンディ SM-525X、株式会社工進)によって沢水を汲み上げ、そのプールの中にポットを設置した。ポットの土壌に土壌水分計(Em50, Decagon Devices, Inc.)を設置して調査期間中、土壌水分含有量を測定したところ、土壌水分含有量は80%~90%で推移した。通水は生育期間中の無積雪の4月~11月行い、冬季間は通水を停止した。

乾燥処理については、道総研林試構内に農業用ビニールハウスを建て、ビニールハウス内の地面に広げたビニールシート上に簀子を敷き、その上にポットを置いて降雨および土壌からの水供給を遮断した。このとき、ビニールハウス内の気温の上昇防止と換気のため、ビニールハウスの側面を解放した。浸水処理と同様にポット苗に土壌水分計を設置して土壌水分含有量を測定したところ、調査期間中の土壌水分含有量は5%~20%で推移した。ビニールハウスによる降雨遮断は生育期間中の無積雪の4月~11月とし、冬季間は屋根を外して積雪中で越冬させた。

浸水処理および乾燥処理に対する無処理として、道総研林試構内の苗畑に15本のクロマツ苗を植栽した。植栽地付近に土壌水分計を設置して土壌水分含有量を測定したところ、調査期間中の土壌水分含有量は30%~40%で推移した。なお、無処理のクロマツ苗は2012年~2013年にかけての積雪期間中、記録的な豪雪によって11個体が枯死した。そのため、2013年調査分の無処理については、参考値として扱うことにする。

研究期間最終年の2013年5月、新たにクロマツ特号苗をビニールポットに移植し、浸水処理、乾燥処理、無処理に分け(各処理6個体)1生育期間終了後にポットから抜き取って生葉(当年生葉と2年生以上の葉に分類)枝・幹、そして根系に分割し、120に設定した乾燥機で1週間乾燥し、それぞれの部位の絶乾重量を測定した。なお、クロマツの葉の平均寿命は約2年であり、3年生以上の葉が少ないため、これ以降、当年生葉以外は2年生葉と記述することにする。

(2) 生理生態学的調査

クロマツ針葉における強い水ストレスへの応答様式を評価するため、浸水処理、乾燥処理、無処理の苗から毎年10月に針葉を採取し、各個体10本について針葉長を測定した後、葉のクロロフィル含有量を測定するため、一部の針葉をチャック月ビニール袋に封入して-80の冷凍庫で保管した。このとき針葉は、光合成活動が最も活発とされる2年生葉を対象とした。またN量および ^{13}C を分析するため、残りの針葉について乾燥機で乾燥(80、24時間)させて保管した。このとき、針葉が短いためにN量を十分に測定できないと考えられた際には、針葉長を測定す

る
分以外にも針葉を採取した。

クロロフィル含有量の測定は、北海道大学大学院農学研究科造林学研究室所有の分光光度計 (GeneSpec III, 日立) を使用した。クロロフィルは DMSO (ジメチルスルホキシド) に溶出させて測定した。測定波長は 665nm と 648nm の 2 種類である。クロロフィルの溶出に当たっては、容量 5ml のチップに、冷凍保管していた試料 (生葉) 約 20mg を入れたのち、DMSO を 2ml 加え、65 °C に設定した恒温器に 72 時間程度置いた。このとき、別に N 量および ^{13}C の分析のために乾燥保存する予定の葉を用いて、各試料の含水率を推定しておいた。分光光度計による測定値から、Chl a および Chl b 含有量は以下の式で推定した。
$$\text{Chl a } (\mu\text{g mg}^{-1}) = (14.85A_{665} - 5.14A_{648}) / (2/\text{乾重}) \cdots (1 \text{ 式})$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g mg}^{-1}) = (25.48A_{665} - 7.36A_{648}) / (2/\text{乾重}) \cdots (2 \text{ 式})$$

N 量の測定には道総研林試所有の全自動元素分析装置 (vario MAX CNS, Elementar Analysensysteme GmbH) を使用した。

^{13}C は、愛媛大学沿岸環境科学センター所有の質量分析器 (GC-MS, ANCA-SL, SerCon, Ltd) を用いて分析した。このとき、樹脂が ^{13}C 値に影響を及ぼす可能性を考慮して、あらかじめ生葉の樹脂をプレッシャー・チャンバー (PMS 水ポテンシャル測定装置、明和商事株式会社) で排出させた試料 (10 個体分) も分析したが、樹脂が ^{13}C 値に影響を与えていると疑われるような差異は認められなかった。

葉の蒸散速度は三木・廣部 (2009) による失水曲線法 (重量法) を採用した。三木・廣部 (2009) によると、この方法は採取した植物体を一度十分に飽和させた後、制御した一定の環境条件下において、失水による重量変化を比較的長時間 (5 時間から 10 時間程度) 連続的に測定することで得ることができ、気孔蒸散とクチクラ蒸散を分けて推定することが可能である。三木・廣部 (2009) が提案した理論モデルは次の通りである。植物体の蒸散量を TT とすると、

$$TT = TS_{\max} \times (1 - e^{-kt}) / k + Tc \times t \cdots (3 \text{ 式})$$

ここで、 TS_{\max} は最大気孔蒸散速度、 Tc はクチクラ蒸散速度、 k は気孔閉鎖に関する定数、そして t は時間を表す。

葉からの蒸散速度を測定するにあたり、クロマツの枝を採取した後ただちに水切りをし、黒いビニール袋で覆って一晩十分に吸水させた。切り枝から葉を採取した後、切断面からの失水防止のためただちに切断面にワセリンを塗布した。そして植物育成ライト (LED Grow light, Parus: 波長 430nm ~ 470nm, 650nm ~ 660nm) 下 12cm に鏡面を置き、そしてライト下約 10cm の位置になるよう鏡面上に針葉を置いて、おおよそ 10 分 ~ 15 分間隔で 3 時間 ~ 10 時間ほど針葉重量を測定した。針葉重量の減少を蒸散による失水量とみな

し、3 式に回帰して TS_{\max} 、 Tc 、 k を推定した。回帰分析には DeltaGraph ver. 6 (RedRock) を用いた。

なお、本研究では当初水ポテンシャル Ψ (平衡圧) も測定することを予定していたが、強度に水ストレスをかけたクロマツ苗の針葉長が、短いものでは 2cm 程度となり、プレッシャー・チャンバーで Ψ を測定することが不可能な針葉が多かったため、この測定項目は割愛することにした。

(3) 過湿による衰退現場での状況

調査は北海道長万部町旭浜におけるクロマツ海岸林造成地で行った。当造成地は、多くの部分が過湿と推定される症状により衰退している (Masaka *et al.*, 2010)。2006 年、この造成地を激害地 (1994 年植栽) とし、周辺にある比較的健全と考えられる造成地を微害区 (1998 年植栽) として調査地を設定し、先行的に調査を行っている。各調査区における調査木数は、試験地設定当時 20 個体だったが、2011 年には激害区は 14 個体、微害区では 17 個体に減少している。本研究ではこの調査地を用い、ポット苗で行う調査と同様な項目を測定し、激害地における衰退原因について生理生態学的に評価する。

4. 研究成果

(1) 強い水ストレスを受けた個体の形態

表 1 に、浸水処理、乾燥処理、そして無処理における苗木の各部位の平均絶乾重を示す。一般化線形モデル GLM によって、各処理のあいだで根重、枝重、葉重 (当年生葉と 2 年生葉) を比較したところ、根重および枝重は浸水処理と乾燥処理をプールした場合にもっとも低い AIC 値を得た。そのため、根系と枝部の成長は同程度に抑制されたと言える。葉については、当年生葉が乾燥処理 < 浸水処理 < 無処理の順で重量が大きくなる傾向にあるといえ、2 年生葉になると浸水処理がもっとも重量が低い結果となった。このことから、浸水処理では葉からの蒸散を防いで強い水ストレスを軽減するために、もっとも光合成活動が活発な 2 年生葉を落としたものと推察される。

表 1. 一生育期間後の苗木の各部重量 (絶乾重: g)

	2 年生葉	当年生葉	枝	根
無処理	20.2 ± 7.2 ^a	15.2 ± 3.7 ^a	23.7 ± 9.1 ^a	40.4 ± 17.4 ^a
浸水処理	4.6 ± 1.4 ^b	7.7 ± 2.6 ^b	17.3 ± 2.6 ^b	20.3 ± 4.0 ^b
乾燥処理	18.7 ± 5.6 ^a	4.2 ± 1.0 ^c	17.6 ± 5.3 ^b	23.8 ± 5.4 ^b

補注: データは平均値 ± 標準偏差。異なるアルファベット記号は、一般化線形モデルにおいて別のグループとして評価した際に最少の AIC が得られた組み合わせ。

(2) 葉の N 量およびクロロフィル含有量

2011 年、2012 年、そして 2013 年ともに N 量およびクロロフィル量 (Chl a + Chl b) は浸水処理 < 乾燥処理 < 無処理の順で大きくなる傾向が認められた (表 2、3)。N 量に対するクロロフィル含有量について GLM 分析したところ、2011 年と 2012 年はほぼ同様の

傾向を示したが、2013年は若干、切片は小さくなった(図1)。ただし、これは2013年は無処理個体が雪害によって多数消失してしまったためのバイアスとも考えられるため、2013年のデータについては評価の対象から外す。いずれにせよ、説明変数であるN量の係数が2.2951と1以上であることから、浸水処理では無処理と比較して窒素をクロロフィルに優先的に投資できていないことが示唆される。

表2. 針葉中の窒素含有量(%)

	2011年	2012年	2013年
無処理	1.12 ± 0.07 ^a	1.30 ± 0.11 ^a	1.19 ± 0.36 ^a
浸水処理	0.75 ± 0.15 ^b	0.67 ± 0.12 ^b	0.49 ± 0.12 ^b
乾燥処理	1.04 ± 0.11 ^c	1.16 ± 0.14 ^c	0.99 ± 0.17 ^c

補注: データは平均値±sd. アルファベット記号は表1と同様.

表3. 針葉中のクロロフィル含有量(a+b; μg/mg)

	2011年	2012年	2013年
無処理	2.52 ± 0.31 ^a	2.55 ± 0.33 ^a	3.32 ± 0.48 ^a
浸水処理	0.88 ± 0.23 ^b	1.33 ± 0.22 ^b	0.86 ± 0.28 ^b
乾燥処理	1.70 ± 0.38 ^c	1.75 ± 0.37 ^c	1.93 ± 0.57 ^c

補注: データは平均値±sd. アルファベット記号は表1と同様.

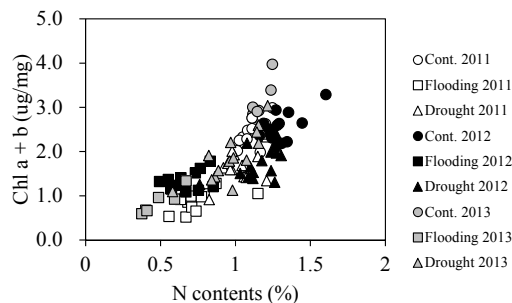


図1. N含有量に対するクロロフィルへの投資量.

(3) 耐乾性の指標としての ¹³C

GLM分析の結果、2011年については、¹³C値は浸水処理と無処理をプールした場合に、2012年と2013年については3つの処理を独立にした組み合わせにおいて、もっとも低いAIC値が得られた(図2)。

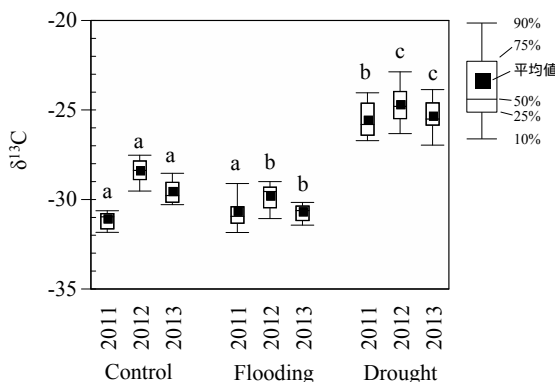


図2. 各処理における針葉の炭素安定同位体比(¹³C)の違い。比較は同一年内の処理間で行った。

つまり乾燥処理の苗における ¹³C 値は、浸水処理と無処理よりも有意に高い値ということであり、これはすなわち、乾燥処理のクロマツ苗は、葉からの蒸散を防止するために気孔を閉じる傾向にあることを示唆している。一方、浸水処理のクロマツ苗における ¹³C 値は、2012年と2013年については無処理のクロマツ苗よりも若干小さな値となったことから、浸水処理におけるクロマツ苗は、気孔が無処理以上に開いており、強い水ストレスに曝されている中で蒸散が進んでいることが示唆される。

(4) 葉の蒸散速度

失水曲線法を用いた蒸散速度の推定では、乾燥処理したクロマツ苗の葉の重量減少がほとんど認められなかったため、ここでは浸水処理と無処理を比較する。

図3に2012年8月、ならびに2013年8月に測定した結果を示す。失水曲線から得られた3つのパラメータTS_{max}(最大気孔蒸散速度)、Tc(クチクラ蒸散速度)、k(気孔閉鎖に関する定数)は、季節を問わず、また2012年と2013年で、いずれも浸水処理の方が無処理よりも大きい傾向が認められた(GLM分析)。この結果は、浸水処理におけるクロマツ苗の葉からは、無処理におけるクロマツ苗の葉からよりも有意に蒸散によって水分が失われていることを示唆する。なお、乾燥処理において針葉の重量減少がほとんど認められなかったのは、気孔が閉ざされ、クチクラ表面からの蒸散も抑制されていることが強く示唆される。

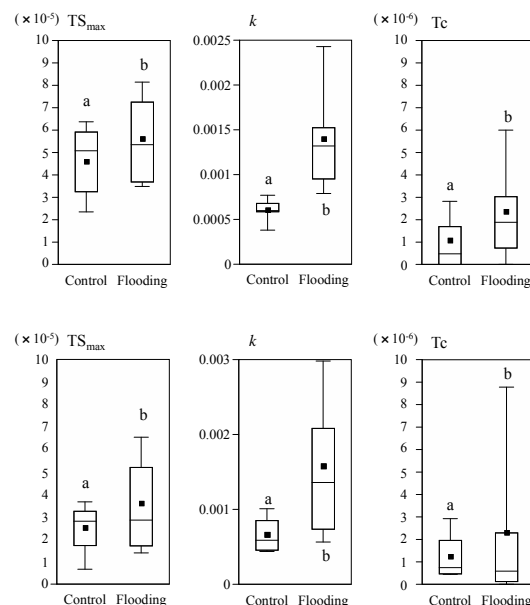


図3. クロマツ葉の蒸散速度。上段が2012年8月、下段が2013年8月に測定。

ここで、2012年10月に採取したクロマツ生葉のクチクラ層について、凍結クロマツ針

葉の中央部付近の根元に近い部分から試料を切り取り、凍結ステージを装着したスライディングマイクロトームを用いて、横断面の切片（厚さ約 25 μ m）を作成し（図 4）、厚さを処理間で比較したところ、平均値では浸水処理 < 乾燥処理 < 無処理の順で厚くなったが、GLM 分析を行ったところ、浸水処理と乾燥処理をプールした際にもっとも小さな AIC 値が得られた。また、表皮の下に分布する厚壁細胞は、横方向の長さは処理間で差異は認められなかったものの、縦方向では乾燥処理と無処理をプールした際にもっとも低い AIC 値が得られ、かつ浸水処理において短い傾向があった。この結果は、浸水処理ではクチクラ層よりもむしろ、厚壁細胞がクチクラ蒸散と関わっている可能性が示唆される。

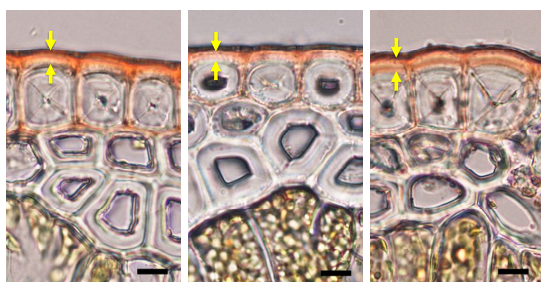


図 4. 各処理におけるクロマツ葉切片の例。矢印に挟まれた部分がクチクラ層。クチクラ層直下の細胞層が厚壁細胞になる。スケール・バーは 10 μ m。北海道大学 渡邊陽子博士に調査依頼。

(5) 過湿による衰退現場での状況

長万部町旭浜のクロマツ海岸林造成地に設定した激害区および微害区におけるクロマツ植栽木の針葉の N 量およびクロロフィル含有量を、それぞれ表 4 と表 5 に示す。GLM 分析を行ったところ、いずれも激害区と微害区で有意な差異は認められなかった。

表 4. 針葉中の窒素含有量 (%) .

	2011 年	2012 年	2013 年
微害区	1.45 \pm 0.08 ^a	1.11 \pm 0.13 ^a	0.97 \pm 0.06 ^a
激害区	1.49 \pm 0.20 ^a	1.11 \pm 0.14 ^a	0.94 \pm 0.12 ^a

補注：データは平均値 \pm sd. アルファベット記号は表 1 と同様。

表 5. 針葉中のクロロフィル含有量 (a+b; μ g/mg) .

	2011 年	2012 年	2013 年
微害区	2.49 \pm 0.48 ^a	2.04 \pm 0.24 ^a	1.54 \pm 0.13 ^a
激害区	2.36 \pm 0.36 ^a	1.84 \pm 0.23 ^a	1.63 \pm 0.18 ^a

補注：データは平均値 \pm sd. アルファベット記号は表 1 と同様。

¹³C について激害区と微害区の差異を GLM 分析によって評価したところ、2011 年分および 2012 年については激害区と微害区は分けた場合に AIC が最小となり、2013 年については差異がないという null モデルにおいて AIC が最小となった（図 5）。図 5 には、先行調査ではあるが 2006 年および 2008 年の結果も

示す。2006 年・2008 年ともに微害区と激害区を分けた場合に AIC が最小となった。これらの結果は、最近まで激害区のクロマツ植栽木の方で有意に ¹³C が低い傾向があり、微害区のクロマツ植栽木と比較して外気を多く取り込んでいることを示唆している。

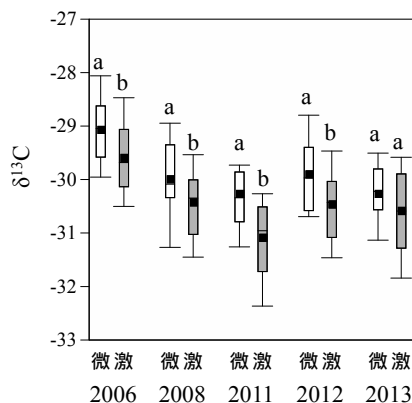


図 5. 微害区と激害区におけるクロマツ植栽木の針葉の炭素安定同位体比 (¹³C) の分布。2006 年と 2008 年のデータは先行調査による。比較は同一年内の処理間で行った。

2013 年に激害区と微害区で差異が認められなくなったのは、激害区では年々調査木が枯死し、その枯死した調査木の ¹³C 値が、微害区の平均値よりも低かったためである（たとえば 2011 年に -32.19 を示した個体が 2012 年には枯死した）。またほかに、差がなくなった原因として、激害区で生き残ったクロマツ個体が、先に死亡した個体よりも強い水ストレスを受けていなかったとも推察される。先行研究で明らかにしているように、旭浜の地表下には難透水性の埋没火山灰層が分布しているが（Masaka *et al.*, 2010）、その深度（厚み）は場所によってさまざま、しかも局所的に埋没火山灰層がみられない場所もある。このような局所的にヘテロな立地によって、強い水ストレスを受けていた個体ほど優先的に消失していったものと推察される。いずれにせよ、激害区におけるクロマツの蒸散速度は高い傾向にあり、さらに加えて ¹³C が微害区のクロマツより低い傾向があることいえる。

激害区と微害区でクロマツの蒸散速度を測定したところ、ポット苗を用いた試験結果ほどには明瞭ではないものの、激害区のクロマツの方がわずかに蒸散速度（クチクラ蒸散）が高いことが明らかになった（図 6）。この結果から、ポット苗を用いた試験結果と同様に、気孔が開き気味のために強い水ストレスに曝され、衰退が進んでいるものと推察される。ただし、ポット苗を用いた試験ほどに明瞭な違いが認められなかったのは、常時滞水するような環境ではないためであろう。そのため、植栽苗の死亡数も緩慢に推移し、造成地の衰退原因の把握が遅れたものと考えられる。

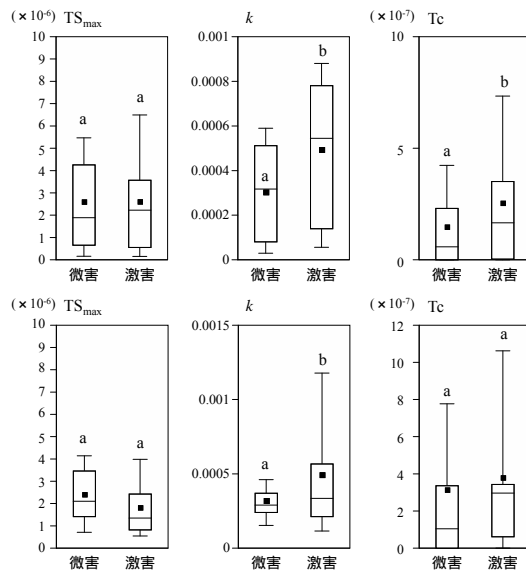


図 6. 長万部町旭浜のクロマツ海岸林造成地におけるクロマツ針葉の蒸散速度。
上段が 2012 年 8 月、下段が 2013 年 8 月に測定。

(6) 結論

滞水・過湿環境に曝された樹木は、樹体内の植物ホルモンのバランスが崩れ、また毒素が集積して衰退すると説明されている。しかし一方で、強い水ストレスを受けているにもかかわらず、強い水ストレスへの応答と衰退・死亡プロセスに関する研究はほとんどみられない。

本研究では、水ストレスに注目することで、滞水・過湿立地におけるクロマツの衰退・死亡プロセスの一端を明らかにした。すなわち、滞水・過湿立地のクロマツでは、強い水ストレスを受けているにもかかわらず、気孔やクチクラ層から蒸散がすすみ、衰退しているということである。

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)

[学会発表](計 1 件)

真坂一彦、鳥田宏行、強い水ストレスに曝されたクロマツの生理生態学的な応答、第 61 回北方森林学会大会、2012 年 11 月 13 日、札幌コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真坂 一彦 (MASAKA, Kazuhiko)
地方独立行政法人北海道立総合研究機構・その他部局等・研究員
研究者番号：60414273