

高 CO₂と窒素付加環境で生育した落葉広葉樹個葉の被食防衛物質の局在

北海道大学大学院農学院 日向 潔美
北海道大学大学院農学研究院 渡邊 陽子・渡辺 誠
森林総合研究所北海道支所 北岡 哲・飛田 博順・上村 章
宇都木 玄・北尾 光俊
北海道大学大学院農学研究院 小池 孝良

はじめに

近年、大気 CO₂濃度の上昇や窒素沈着量の増加など、地球規模の環境変動が進行している。これらの環境変動によって、植物の葉の質が変化し、それを利用する植食者は影響を受ける。それにより生物間の相互関係が変化することが予想される(6,10)。環境変動によって影響を受ける葉の質の一つに、植食者の食害に対して植物が持つ被食防衛能力がある。つまり、環境変動によって葉内の炭素と窒素の比(C/N)比が変化することにより植物の被食防衛能力に影響を与えることが報告されている(6,9)。森林は生物多様性を維持する貴重な場であることから、環境変動下での生物間相互作用の一つである樹木の被食防衛能の変化を明らかにする必要がある。

被食防衛とは、植食者による食害に対して植物が持つ防御機構を意味し、物理的防御と化学的防御に分けられる。物理的防御は、葉を硬くしたり、葉の表面にトリコームを発達させることによる防御を指す(7)。化学的防御は、葉内に被食防衛物質を生産し蓄積させることによる防御を指し、植食者がそれを食べると消化不良や成長阻害を起こす。これらの防御物質は、光合成産物に由来する二次代謝産物であり、落葉広葉樹の葉では、被食防衛物質として縮合タンニンなどのフェノール類を葉内に蓄積させる。

炭素ベースの二次代謝産物は炭素と養分の得やすさによって決まるとする炭素・栄養バランス(CNB)仮説が提唱されている。この仮説によると、CO₂濃度の上昇や養分不足などにより炭素が余剰に蓄積した場合、フェノール類などの被食防衛物質量は増加し、逆に、被陰、施肥などにより炭素に比べ相対的に養分が余剰な場合、フェノール類などの被食防衛物質量は減少する。これまでの研究から、高 CO₂環境下でフェノール類などの被食防衛物質の増加が報告されているが、土壌中の窒素含有量などの生育条件に影響を受けること、樹種によって応答が異なることが指摘されている(6, 8, 9)。

一方、これらの先行研究は、全葉を対象とした被食防衛物質の定量によるものが主流で、個葉をすりつぶして被食防衛能を評価してきた。樹木葉の被食防衛物質の生産と個体成長は、両者とも光合成産物を利用するためト

レードオフの関係が成り立つと考えられる(4,11)。したがって、防御物質の生産は個体成長により制限されるため、防御物質を葉内に均一に分布させるのではなく、重要な器官や組織などに分布させて効率よく防御する、すなわち葉内に被食防衛物質を局在させることが考えられる。したがって、樹木葉の被食防衛物質の働きに関して、その量だけでなく、葉内での局在についても組織化学的な視点から調べる必要がある(ここで局在とは、表皮や柵状組織など葉の内部組織のどこに防御物質が分布しているかを指す)。先行研究では、大塚ら(12)により、生育環境の違いによって被食防衛物質の局在様式が変化することが解明された。高 CO₂環境下で葉内の被食防衛物質の量が増加するならば、それに伴って被食防衛物質を葉内に広く分布させることができ、局在する場所が変化するのではないかと予想される。

そこで、本研究では将来進行が予測される高 CO₂環境と土壌への窒素沈着量の増加が、樹木の葉の被食防衛能力に与える影響を明らかにすることを目的に、それらの影響を被食防衛物質の量と局在に着目して調べた。

材料と方法

材料：冷温帯落葉広葉樹林の主要構成樹種であるブナとミズナラを対象とした。2007年5月、これらの2年生稚樹を直径21 cmのポット(土壌は鹿沼土、赤玉土を1:2で混合)に植え付け、森林総合研究所北海道支所内の環境調節室内で生育させた。CO₂処理は、高 CO₂処理区を720 μmol mol⁻¹、対照区を360 μmol mol⁻¹とし、窒素処理は、窒素付加区で15 kg・ha⁻¹・yr⁻¹、対照区で4 kg・ha⁻¹・yr⁻¹の窒素を硫酸アンモニウム((NH₄)₂SO₄)で与えた。北海道の最近の報告では3~7 kg・ha⁻¹・yr⁻¹の窒素が大気降下物としてもたらされているとされ、それに加えリターからの窒素供給なども考慮して、付加区ではその倍量の15 kg・ha⁻¹・yr⁻¹とした。

方法：8月上旬に成熟葉をサンプリングし、1枚の葉から被食防衛物質の局在観察用と単位面積当たりの葉乾重(LMA)測定に使う部分を採取し、残りの部分を被食防衛物質の定量分析に用いた。LMAは、リーフパンチでディスクを打ち抜き、ディスクを60℃、2日間乾燥させて

Kiyomi HINATA (Grad. School. Agr., Hokkaido Univ. Sapporo 060-8589), Yoko WATANABE, Makoto WATANABE (Res. Fac. Agr., Hokkaido Univ. Sapporo 060-8589), Satoshi KITAOKA, Hiroyuki TOBITA, Akira UEMURA, Hajime UTSUGI, Mitsutoshi KITAO (FFPRI, Sapporo 062-8516), Takayoshi KOIKE (Res. Fac. Agr., Hokkaido Univ. Sapporo 060-8589)
Localization of defense chemicals in leaves of deciduous broad-leaved tree seedlings grown under elevated CO₂ and nitrogen supply

乾燥重量を測定し算出した。被食防衛物質の定量は、葉を凍結乾燥機(FLEXY-DRY, FTS systems USA)で乾燥させ、ミルで粉碎した後、総フェノール量と縮合タンニン量を測定した。総フェノール量は Folin-Ciocalten 法で(5)、縮合タンニン量は塩酸ブタノール法で定量した(1)。被食防衛物質の局在は、以下の方法で葉の樹脂包埋を行い、光学顕微鏡(Axioskop2 Plus, Carl Zeiss, Jena, Germany)にて観察した。葉の小片を4%グルタルアルデヒド溶液で固定した後、48時間10%FeSO₄に浸漬した。その後、試料をアルコールシリーズで脱水し、エポキシ樹脂で包埋した後、ウルトラマイクロトーム(Ultracut N, eichert, Vienna, Austria)で約1 μm厚の切片を作製した。光学顕微鏡では10%FeSO₄によって染色された液胞中のタンニンの観察が可能である(3)。統計解析は2元配置の分散分析(パラメーターはCO₂、窒素と各々の交互作用)とした。 $p < 0.05$ で有意差あり、 $p < 0.10$ で傾向ありとした。

結果

被食防衛物質の定量：総フェノール量は、ブナ、ミズナラともにCO₂や窒素の処理の効果に有意な差は見られなかった(図-1)。一方、縮合タンニン量に対する各処理による影響は、ブナでCO₂と窒素処理に交互作用に傾向が見られ($p < 0.10$)、高CO₂+窒素対照区で最も高い値を示した(図-2)。ミズナラではCO₂と窒素処理による効果に有意な差は見られなかった(図-2)。

LMA：ブナでは高CO₂処理の方が対照区よりも有意に増加した($p < 0.05$)。一方、窒素処理による有意な差は見られなかったが、窒素付加区よりも対照区で増加傾向が見られた(図-3)。ミズナラではCO₂や窒素の効果に有意な差は見られなかったが、対照区よりも高CO₂処理区で高い傾向を示した($p < 0.10$, 図-3)。

被食防衛物質の局在：ブナでは、対照区の被食防衛物質は主に表皮細胞内に局在しているが、高CO₂処理区では表皮細胞に加え、柵状組織にも分布していた(図-4)。両CO₂処理区においても窒素処理による被食防衛物質の局在する場所の変化はほとんど見られなかった。ミズナラでは、各処理区ともに表皮細胞内に被食防衛物質の局在が見られた。CO₂や窒素処理による被食防衛物質の局在する場所の変化はほとんど見られなかった(図-5)。

考察

被食防衛物質の量は、ブナ、ミズナラともに総フェノール量、縮合タンニン量にCO₂や窒素の処理の効果に有意な差は見られなかった(図-1, 2)。しかしながら、ブナの縮合タンニン量はCO₂と窒素処理の交互作用に傾向が見られ、高CO₂処理+窒素対照区で顕著に高い値を示した(図-2)。これは、窒素対照区では高CO₂下で窒素制限となり、成長への要求よりも剰余となった光合成産物から被食防衛物質の生産が増加した可能性が考えられ、炭素・栄養バランス仮説(2)を支持する結果であると考えられる。一方、ミズナラでは、高CO₂処理でLMAが増加する傾向が見られ(図-3)、葉のリグニン量が有意に増加した(結果は示さず)。このことからミズナラでは、高CO₂処理により増加した光合成産物を、被食防衛物質の生産よりも細胞壁成分(リグニン)等へ、より多く分配さ

せた可能性が考えられる。この結果より、ブナとミズナラでは、高CO₂や窒素処理による資源分配の応答が異なっている可能性が考えられる。

被食防衛物質の局在は、ブナとミズナラともに、どの処理区においても表皮に被食防衛物質が多く分布していた。さらにブナでは、高CO₂処理区で被食防衛物質が表皮だけでなく、柵状組織などの葉肉細胞中にも多く分布していた。これは、有意差はなかったものの、単位面積あたりの被食防衛物質の量が高CO₂処理で増加する傾向が見られた(結果は示さず)ことから、高CO₂処理により被食防衛物質の局在する場所が増加したためと考えられる。この結果は、高CO₂下で被食防衛物質の葉内での分布が拡大するという予想を支持する。また、ミズナラではどの処理区においても局在する場所の変化は見られなかったが、これは定量分析の結果と対応するといえる。以上の結果から、葉の表面からの植食者の侵入を防ぐために、まず表皮に被食防衛物質を多く局在させ、光合成産物が増加すれば葉肉細胞中、特に細胞がつまっていた植食者にとって食べるのに効率が良いが、植物にとっては光合成器官として重要な柵状組織に局在させていると考えられる。この局在する場所の変化は、大塚ら(12)の結果と同様の傾向を示したが、高CO₂処理で局在する場所の変化が観察されたのは初めてである。

以上より、将来予測される高CO₂環境や窒素沈着量の増加により、樹木の被食防衛能力は変化しうることを、また、その変化の度合いは樹種によって異なることが示された。また、ブナやミズナラは固定成長型の特性を持ち、処理1年目では影響が現れにくく、2年目以降に影響が顕著に現れてくる可能性が考えられる。よって今後も、高CO₂や窒素付加による被食防衛能力への影響の観察を継続させていくことが必要である。

謝辞：本研究を実施するにあたり、北海道大学農学部造林学研究室の皆様には数多くのご助言とご支援をいただいた。記して感謝する。本研究費の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究 B,萌芽：代表；小池孝良)の支援を得た。記して感謝する。

引用文献

- (1) Bath-Smith, E.C. (1977) Astringent tannins of *Acer* species. *Phytochemistry* **16**: 1421-1426.
- (2) Bryant J.P., Chapin F.S. III and Klein D.R. (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* **40**: 357-368.
- (3) Bussotti, F., Gravano, E., Grossoni, P. and Tani, C. (1998) Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica*) along an ecological gradient, detected by histochemical and ultrastructural analyses. *New Phytol.* **138**: 469-479.
- (4) Coley, P.D. (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* **74**: 531-536.
- (5) Julkunen-Tiitto, R. (1985) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food. Chem.* **33**: 213-217.
- (6) Knepp, R.G., Hamilton, J.G., Mohan, J.E., Zangerl, A.R.,

Berenbaum, M.R. and DeLucia, E.H. (2005) Elevated CO₂ reduces leaf damage by insect herbivores in a forest community. *New Phytol.* **167**: 207-218.

(7)Koike, T., Matsuki, S., Choi, D., Matsumoto, T., Watanabe, Y. and Maruyama, Y. (2006a) Photosynthesis, Leaf longevity and Defense Characteristics in Trees of Betulaceae Planted in Northern Japan. *Eurasian J. For. Res.* **9-2**: 69-78.

(8)Koike, T., Tobita, H., Shibata, T., Matsuki, S., Konno, K., Kitao, M., Yamashita, N. and Maruyama, Y. (2006b) Defense characteristics of seral deciduous broad-leaved tree seedlings grown under different levels of CO₂ and nitrogen. *Popul Ecol.* **48**: 23-29.

(9)Lincoln, D.E. (1993) The influence of plant carbon dioxide

and nutrient supply on susceptibility to insect herbivores. *Vegetatio* **74**:531-536.

(10)Lindroth, R.L., Kinney, K.K. and Platz, C.L. (1993) Responses of deciduous trees to elevated atmospheric CO₂: productivity, phytochemistry, and insect performance. *Ecology* **74**: 763-777.

(11)Mooney, H.A. and Gulmon, S.L. (1982) Constraints on leaf structure and function in reference to herbivory. *BioScience* **32**: 198-206.

(12)大塚優佳・渡邊陽子・福井富三・間宮春大・藤戸永志・日浦勉・小池孝良 (2007) ブナとミズナラ稚樹の葉の被食防衛物質の局在. *日林北支論* **55**: 62-64.

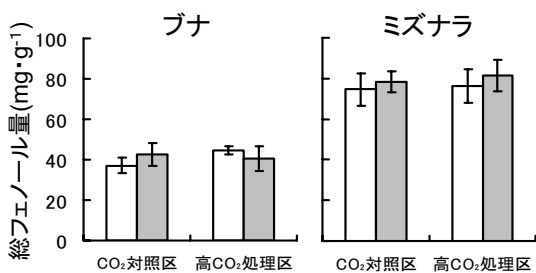


図-1 各処理下での総フェノール量. n=6.

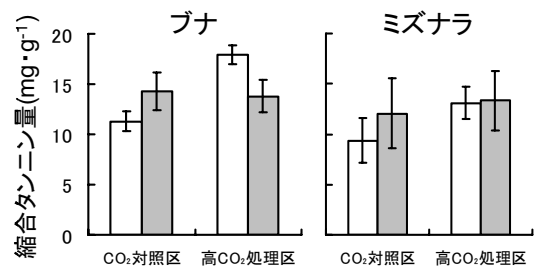


図-2 各処理下での縮合タンニン量. n=6.

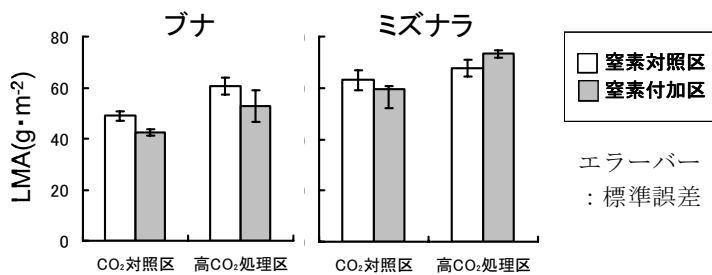


図-3 各処理下でのLMA. n=3.

表-1 分散分析の結果.

種	総フェノール	縮合タンニン	LMA
ブナ	n.s.	n.s.	*
N	n.s.	n.s.	0.089
CO ₂ ×N	n.s.	0.068	n.s.
ミズナラ	総フェノール	縮合タンニン	LMA
CO ₂	n.s.	n.s.	0.075
N	n.s.	n.s.	n.s.
CO ₂ ×N	n.s.	n.s.	n.s.

*P<0.05, P<0.10: P値を記入, n.s.: 有意差なし

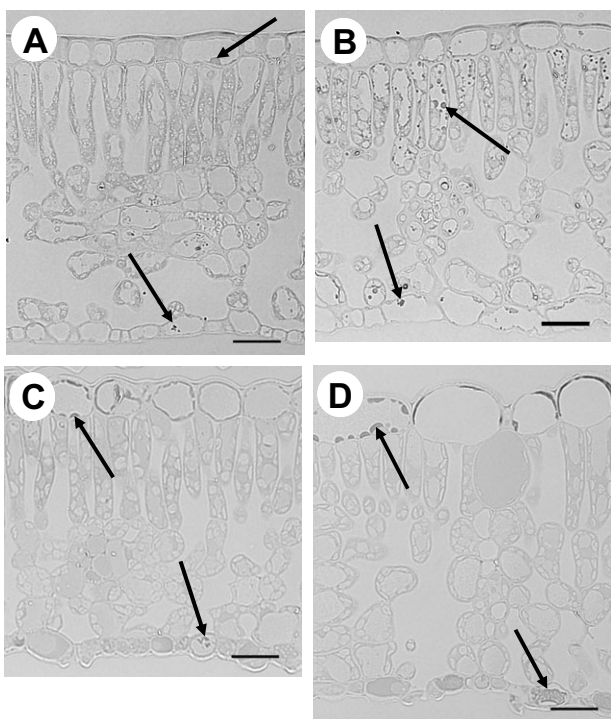


図-4 ブナの各処理における個葉の横断面切片の光学顕微鏡写真.

A: CO₂対照区+窒素対照区

B: 高CO₂処理区+窒素対照区

スケールバー=20 μm.

矢印は被食防衛物質の局在を示す.

図-5 ミズナラの各処理における個葉の横断面切片の光学顕微鏡写真.

C: CO₂対照区+窒素付加区

D: 高CO₂処理区+窒素付加区

スケールバー=20 μm.

矢印は被食防衛物質の局在を示す.