

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

—2 生育期間に渡る処理の影響—

北海道大学大学院農学院

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター

日本学術振興会特別研究員 (北海道大学大学院農学研究院)

森林総合研究所北海道支所

北海道大学大学院農学研究院

日向 潔美

渡邊 陽子

渡辺 誠

北岡 哲・飛田 博順・上村 章・宇都木 玄

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。その結果、生物間の相互関係が変化することが予想される(10,14)。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がある。これまでに、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に影響を与えることが報告されている(10,13)。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し(11)、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。

環境変動下での被食防衛能の変化については、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)仮説に基づいて説明されている(6)。この仮説によると、高 CO₂ 環境下では、光合成産物の生産が増大し、フェノール類などの被食防衛物質が増加すると予測される(3)。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(10,12,13)。

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あるが、被食防衛能を評価する上では、被食防衛物質の量だけでなく、葉内で

の分布も重要である。なぜなら、樹木葉の被食防衛物質の生産と成長は、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(5,15)。したがって、防御物質の生産は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(8)。したがって、被食防衛物質の葉内での局在についても明らかにする必要がある(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)。

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。筆者らは高 CO₂ と窒素付加環境下で1年間生育させた落葉広葉樹の葉の被食防衛能について調べた(7)。ブナでは、高 CO₂ 下で葉の内部構造が発達し、被食防衛物質の局在する部位が増加したが、他の樹種(ミズナラ・ホオノキ)では被食防衛物質の局在や量に、処理による変化はほとんど見られなかった。これは、処理1年目ですぐには応答が見られなかった可能性が考えられ、より継続した調査が必要である。

そこで、本研究では高 CO₂ と窒素付加環境で2年間生育させた落葉広葉樹の葉の被食防衛能について調べ、将来さらなる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に与える影響について、被食防衛物質の局在の視点から明らかにすることを目的とした。

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、ミズナラ、ホオノキの3種を対象とした。2007年5月(ブナは2008年6月)、これらの2年生稚樹を直径21cm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(室温

Kiyomi HINATA (Grad. School. Agr., Hokkaido Univ. Sapporo 060-8589), Yoko WATANABE (Hokkaido Univ. Forest, FSC, Sapporo 060-0809), Makoto WATANABE (JSPA fellow, Res. Fac. Agr., Hokkaido Univ. Sapporo 060-8589), Satoshi KITAOKA, Hiroyuki TOBITA, Akira UEMURA, Hajime UTSUGI (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 – effect of 2 years treatments–

昼 25°C/夜 16°C) で 2 年間生育させた。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 30 kgNha⁻¹yr⁻¹ の窒素を硫酸アンモニウム((NH₄)₂SO₄) で与えた。

方法: 2008 年 (ブナは 2009 年) 8 月中旬 (処理 2 年目) 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 °C, 2 日間乾燥させて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(9)、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) 及び UV 顕微分光光度計 (MPM-80, Carl Zeiss, Jena, Germany) にて観察した。葉の薄片を 4% グルタルアルデヒド溶液で固定した後、光学顕微鏡用試料のみ 1% オスミウム溶液で後固定した。その後、光学顕微鏡用試料と UV 顕微鏡用試料を共に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、ウルトラマイクローム (Ultracut N, Reichert, Vienna, Austria) で約 1 μm 厚の切片を作製した。作製した切片は、光学顕微鏡用試料では主に細胞壁を染色するサフラニンとゲンチアナバイオレットにより二重染色を行い、UV 顕微鏡用試料では UV 顕微分光光度計により 280 nm の波長で写真撮影を行った。光学顕微鏡では 1% オスミウム溶液で固定された液相中のフェノール類の観察が(4)、UV 顕微鏡では 280 nm の UV を吸収する構造を有するフェノール類の観察が可能である。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

1) LMA

ブナでは高 CO₂ 処理で LMA が有意に増加し (P<0.001), ミズナラでは高 CO₂ 処理で増加する傾向が見られた (P<0.10, 図-1)。ブナ, ミズナラともに窒素処理による有意な差は見られなかった。ホオノキでは 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-1)。

2) 被食防衛物質の定量

総フェノール量は、ブナでは高 CO₂ 処理で増加傾向が見られ (P<0.10), 窒素付加により減少した (P<0.05)。ミズナラでは高 CO₂ 処理で有意に増加した (P<0.001)。ホオノキでは 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)。一方、縮合タンニン量は、ブナで高 CO₂ 処理で有意に増加し (P<0.05), 窒素処理による有意な差は見られなかった。ミズナラでは CO₂ や窒素処理の効果に有意な差は見られなかったが、窒素付加により増加する傾向が見られた (P<0.10)。ホオノキは CO₂ や窒素処理による効果に有意な差は見られなかったが、他の 2 種と比較して縮合タンニン量が顕著に低い値を示した (図-3)。

3) 被食防衛物質の局在観察

ブナでは、高 CO₂ 処理により柵状組織が顕著に発達していた。各処理区ともに主に表皮細胞や柵状組織中に被食防衛物質の分布が見られ (図-4), CO₂ や窒素処理による被食防衛物質の局在する部位の変化は見られなかった。ミズナラでは、各処理区ともに主に表皮細胞中に被食防衛物質の分布が見られ、処理による被食防衛物質の局在する部位の変化は見られなかった (図-5)。ホオノキでは、各処理区ともに主に表皮細胞や葉肉細胞中の葉内全体に被食防衛物質の分布が見られた。しかしながら、CO₂ や窒素処理による被食防衛物質の局在する部位の変化は見られなかった (図-6)。

考察

被食防衛物質の量は、処理 1 年目の葉では全ての種において CO₂ や窒素処理の効果に有意な差は見られなかったが(7), 今回の結果では、ブナで高 CO₂ 処理により縮合タンニン量が有意に増加し、窒素付加により総フェノール量が減少した (図-2, 3)。ミズナラでは高 CO₂ 処理により総フェノール量が有意に増加した (図-2)。これらは炭素・栄養バランス仮説(3)を支持する結果であると考えられる。一方、ホオノキは CO₂ や窒素処理による被食防衛物質量への影響は見られなかった。高 CO₂ 環境への応答は種により異なることが報告されているが(2), ホオノキは高 CO₂ 下での被食防衛物質量の変化は見られないと考えられる。また、ホオノキでは他の 2 種と比較して縮合タンニン量が顕著に少なかった (図-3)。縮合タンニンは落葉広葉樹の主な被食防衛物質として働くが、ホオノキは他の物質が被食防衛に関与している可能性がある。

被食防衛物質の局在に関しては、ブナでは、高 CO₂ 処理により柵状組織が発達し、被食防衛物質量が増加したが、被食防衛物質の局在する部位の変化は見られなかった (図-4)。ミズナラもブナ同様、高 CO₂ 処理で被食防衛物質量が増加したが、被食防衛物質の局在する部位は変化しなかった (図-5)。このことから、ブナとミズナラでは被食防衛物質の量は変化しても、局在パターンは変化させなかったと言える。ブナの処理 1 年目の葉の被食防衛物質の局在観察の結果では、対照区では主に表皮に被食防衛物質が分布していたが、高 CO₂ 処理区では表皮だけでなく柵状組織中にも多く分布し、局在する部位が増加していた(7)。一方、今回の結果では処理にかかわらず表皮や柵状組織中に被食防衛物質が分布していた。大塚ら(16)は、ブナで前年の光環境が全天環境では被陰環境と比較して被食防衛物質量が増加し、さらに局在部位が増加することを明らかにした。よって今回、対照区でも柵状組織中に分布させられる量の被食防衛物質を生産できていたと考えられる。また、ブナでは高 CO₂ 処理により柵状組織が顕著に発達した。被食防衛物質の局在する部位は変化しなかったが、発達した柵状組織中での分布を増加させたと考えられる。ミズナラは高 CO₂ 処理で被食防衛物質量が増加したが、分布は処理にかかわらず表皮細胞中のみに見られた (図-5)。表皮細胞中に防御物質を多く蓄積させて表皮を防御していると考えられる。ホオノキは LMA や被食防衛物質と同様、被食防衛物質の局在への CO₂ や窒素処理による影響は見られなかつ

た(図一6)。このことから高CO₂や窒素付加がホオノキの被食防衛能へ与える影響は小さいと考えられる。

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は変化しうること、その応答は樹種により異なることが示された。また、被食防衛物質の量が変化しても、局在パターンを変化させるとは限らないと考えられる。

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：代表；原田光・小池孝良，基盤研究C：代表；渡邊陽子)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)Bidart-Bouzat, M. G. and Imeh-Nathaniel, A. (2008)

Global change effects on plant chemical defenses against insect herbivores. *J. Integr. Plant Biol.* **50**:1339-1354

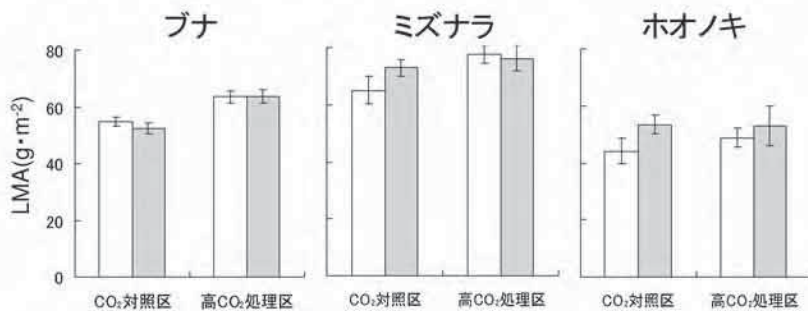
(3)Bryant J.P., Chapin F.S. III and Klein D.R. (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* **40**: 357-368.

(4)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.

(5)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.

(6)Gebauer R.L.E., Strain B.R., Reynolds J.F. (1998) The effect of elevated CO₂ and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Oecologia* **113**:29-36

(7)日向潔美・渡邊陽子・北岡哲・渡辺誠・飛田博順・上

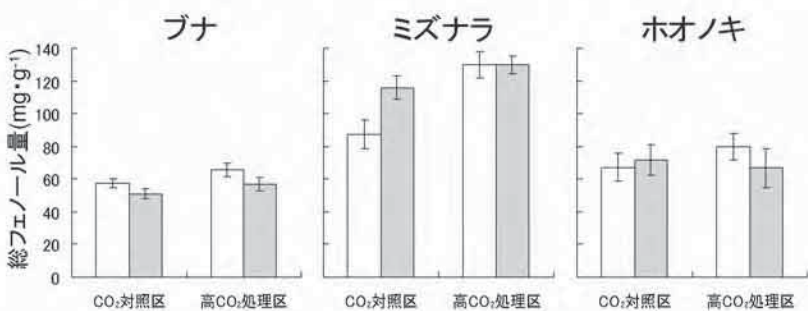


図一 各処理下でのLMA。ブナ n=12, ミズナラ, ホオノキ n=6.

□ 窒素対照区
 ■ 窒素付加区
 エラーバー : 標準誤差

LMA	ブナ	ミズナラ	ホオノキ
CO ₂	***	0.055	n.s.
N	n.s.	n.s.	n.s.
CO ₂ ×N	n.s.	n.s.	n.s.

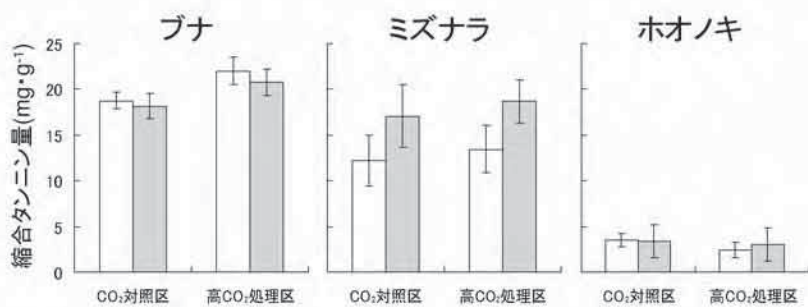
***P<0.001, P<0.10: P値を記入, n.s.: 有意差なし



図二 各処理下での総フェノール量。ブナ n=12, ミズナラ, ホオノキ n=6.

総フェノール	ブナ	ミズナラ	ホオノキ
CO ₂	0.067	***	n.s.
N	*	0.068	n.s.
CO ₂ ×N	n.s.	0.071	n.s.

***P<0.001, *P<0.05, P<0.10: P値を記入, n.s.: 有意差なし



図三 各処理下での縮合タンニン量。ブナ n=12, ミズナラ, ホオノキ n=6.

縮合タンニン	ブナ	ミズナラ	ホオノキ
CO ₂	*	n.s.	n.s.
N	n.s.	0.087	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

村章・宇都木玄・北尾光俊・小池孝良 (2009) 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. 日林北支論 57: 45-47

(8)日向潔美・渡邊陽子・小池孝良 (2009) 樹木の被食防衛物質の局在. 北方林業 61:100-103

(9)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.

(10)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.

(11)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.

(12)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.

(13)Lincoln, D.E. (1993) The influence of plant carbon dioxide and nutrient supply on susceptibility to insect herbivores. Vegetatio 74:531-536.

(14)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.

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

(16)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.

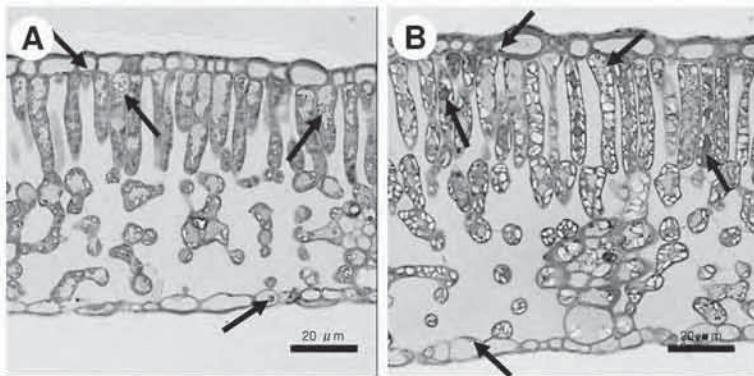


図-4 ブナの各処理における個葉の横断面切片の光学顕微鏡写真。
A: CO₂ 対照区+窒素対照区
B: 高 CO₂ 処理区+窒素付加区
矢印は被食防衛物質の局在を示す。

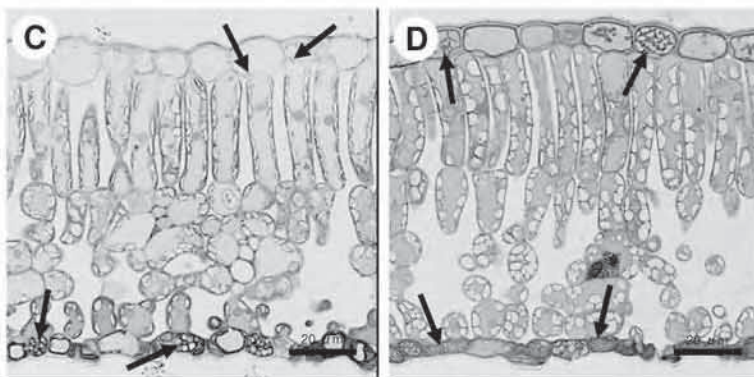


図-5 ミズナラの各処理における個葉の横断面切片の光学顕微鏡写真。
A: CO₂ 対照区+窒素対照区
B: 高 CO₂ 処理区+窒素付加区
矢印は被食防衛物質の局在を示す。

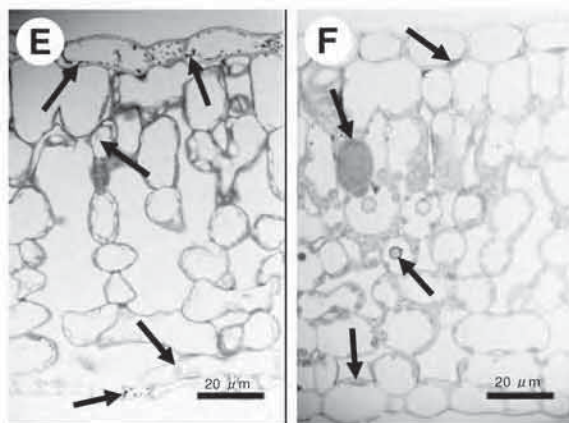


図-6 ホオノキの各処理における個葉の横断面切片のUV顕微鏡写真。
A: 高 CO₂ 処理区+窒素対照区
B: 高 CO₂ 処理区+窒素付加区
矢印は被食防衛物質の局在を示す。