

ブナとミズナラ幼樹の処理2年目における誘導防御の経時変化

北海道大学大学院農学院
北海道大学大学院農学研究院

青山 千穂
小池 孝良

はじめに

植物は植食者に食われることを防ぐため、「防御」を施している。この防御には、光合成の二次代謝産物を主な材料として葉を硬くしたり、トゲやトリコーム（毛状体）などを持つことにより植食者が採食しにくくなる「物理的防御」と植食者にとって不快な味や匂い、毒作用を持つことによって防御する「化学的防御」などが存在する。

しかし、落葉樹の場合、防御と成長（主にリグニンの生産）は同じ物質代謝産物（フェニルアラニン）を用いるため、トレードオフの関係が成り立つと考えられている（2,6）。つまり、防御にはコストがかかるので、防御のみに光合成産物を分配すると成長や繁殖が出来なくなってしまう。そこで、ある一定の防御である「恒常的防御（constitutive defense）」と、更なる食害を回避するために食害が起こってから防御物質の生産を始める「誘導防御（Induced defense）」が存在する（7）。防御を最低限に抑えて必要に応じて行う誘導防御は、コストがかかる防御を柔軟に運用することのできる効率のよい手段であると考えられている。

本研究ではこの防御の中でも特に、「誘導防御」に着目し、以下の2つの視点から研究を計画した。まず1つ目は防御の経時変化である。ブナ、ミズナラ、シラカンバの3樹種において、マイマイガによる食害処理を加え、夏の1度のサンプリングでの防御の誘導実験を行った（1）。その結果、ブナは総フェノール量が増加していることが認められた。しかし、樹種によって誘導防御の応答速度や持続時間も異なると考えられるので本研究では食害処理からサンプリング時期を細かく区切り、分析を行った。

2つ目は土壤中の養分条件である。一般的に植物の防御には葉内の炭素と窒素のバランスが密接に関係していると考えられている。これを Carbon Nutrient Balance Hypothesis：通称 CNB 仮説という（4）。加えて、褐色森林土では窒素が不足する場合があることから試験区を大きく2つに分け、窒素を付加する区としない区を設け、土壌の窒素養分の違いが誘導防御の応答に及ぼす影響を追跡した。

以上より、本研究では食われる立場の樹木に焦点を当て、「誘導防御」という樹木が食害を受けてから誘導される防御について経時変化を追うこと、加えて土壌の窒素養分が与える影響という視点から誘導防御を調べることにより、基礎的な知見の収集を行うことを目的とした。なお、本研究は継続実験の2年目の結果のみを記した。

材料と方法

本研究は北方生物圏フィールド科学センター札幌研究林実験苗畑で行った。土壌は褐色森林土である。使用した樹種は、冷温帯林の主要構成樹種である、ブナ (*Fagus crenata*)、ミズナラ (*Quercus mongolica* var. *crispula*) の2樹種を対象とした。両樹種とも約10年生で、ブナは樹高1.5~2m、ミズナラは樹高3~4mのものを用いた。なお、樹木の反復数は後述する。

本研究で行った処理は以下の2つであり、2009年・2010年と2年間連続で処理を行っている。

1) 食害処理

これは、実際に植食者に食べさせ、人為的に誘導防御を起こさせる処理である。開葉から10日後の5月上旬、外部から植食者が入り込まないように、ブナとミズナラの1個体当たり3枝に袋がけを行った。袋は遮光率18%、0.4mmのメッシュの寒冷紗（三晃化学、札幌）をミシンで縫い、袋の口部分を針金で留めた。開葉から30日後の5月中旬に春先の食害を想定し、植食者として広食性のマイマイガ (*Lymantria dispar*) の3齢幼虫を袋に入れ、シュートの各個葉を約20%食べた6月上旬時点でマイマイガを取り出した。

2) 窒素処理

土壌中の養分条件、以下窒素処理についてである。試験地を大きく2つに分け、2008年5月上旬と2009年5月上旬の2年間にわたり、30 kgN ha⁻¹ yr⁻¹の窒素を硫酸アンモニウム ((NH₄)₂SO₄) によって付加した区、及び対照区を設置した。この数値の目安は近年関東周辺の都市近郊で観測された窒素沈着量を目安にしている（1）。

使用した樹種は処理ごとにそれぞれ4個体、計32個体を用意し、その個体の中から食害処理後0日（6月上旬）、5日、10日、20日、30日、50日（8月上旬）と計6回、時間を追って葉をサンプリングし、1回のサンプリングで1個体3枚の葉を採取した。なお、食害処理区のサンプリングした葉は食害を受けた葉とした。

サンプリングした葉は、1枚の葉から葉の堅さの指標である単位面積当たりの葉重量、通称 LMA(mg/cm²)と、残りの葉部分を化学分析用とした。LMA測定用に葉をリーフパンチでディスクを打ち抜き、60℃のオープンで2日間乾燥させた後、乾燥重量を測定し LMA を求めた。LMA を測定した後のリーフディスクは NC-Analyzer (NC-900, 島津住化, Japan) で炭素と窒素含有量を求めた。

Chiho AOYAMA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo 060-8589),

Takayoshi KOIKE (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo 060-8589)

Temporal changes of induced resistance in the saplings of *Fagus crenata* and *Quercus mongolica* var. *crispula* in second year.

残りの部分は、凍結乾燥機 (FLEXY-DRY, FTS systems, USA) で乾燥させ、ミルで粉碎した後、化学的な防御として炭素骨格の二次代謝産物である総フェノール量 (mg/g, Folin - Ciocalteu 法, Julkunen - Titto 1985) と縮合タンニン量 (mg/g, 塩酸ブタノール法, Bath - Smith 1977) を定量した。

また、統計処理としては R を用いてサンプリング時期ごとに食害処理と窒素処理を要因とした Two-way ANOVA で解析を行った。

結果

ブナ: LMA, 葉の窒素含有量, CN 比では、全サンプリング時期で食害・窒素処理ともに有意な差が見られた (図 1 - 1, 4, 5)。また、総フェノール量, 縮合タンニン量では、処理後 0・50 日では窒素処理で、5・10・20・30 日では食害・窒素処理ともに有意な差が見られた (図 1 - 2, 3)。

ミズナラ: 50 日目の窒素付加処理個体は、葉がすでに枯れてしまっていたためサンプルが欠損している。

LMA は、処理後 0・5・10 日では食害・窒素処理ともに有意な差があるが、20 日では窒素処理、30 日では食害処理のみ有意な差が生じた。また、50 日も有意な差が生じていた (図 2 - 1)。総フェノール量は、処理後 0・10・20 日では食害・窒素処理ともに有意な差があるが、5・30 日では窒素処理のみ有意な差が生じた。また、50 日も有意な差が生じていた (図 2 - 2)。縮合タンニン量は、処理後 10・30 日では食害処理のみ、5・20 日では窒素処理のみで有意な差が生じた (図 2 - 3)。葉の窒素含有量は、全サンプリング時期において窒素処理で有意な差が生じ、処理後 30 日でのみ食害処理でも有意な差が生じた (図 2 - 4)。CN 比は、処理後 0 日では食害・窒素処理ともに有意な差があるが、20・30 日では窒素処理、5・10 日では食害処理のみ有意な差が生じた。また、50 日も有意な差が生じていた (図 2 - 5)。

考察

ブナは LMA, 葉の窒素含有量や CN 比は 2 年目の処理が始まる前の処理後 0 日から差が生じていた。これらの項目で差が生じた原因は、ブナでは翌年に開葉する葉原基は前年に形成されるため、この影響があると推察した (8)。また、処理 5 日後から防御が誘導され、50 日後には終息していることが示された。このブナの防御の低下は、ヤナギ (*Salix cinerea*) をハムシ成虫 (*Phratora vulgatissima*) に食べさせ防御を誘導させた実験 (4) でも、本研究と同様に 30~40 日後にはトリコームの生産が低下したことが確認されている。この例のように効率のよい防御を行っていると考えた。そして、窒素処理によって恒常的な防御量が少なくなること、防御も誘導されにくくなることも示された。これは、CNB 仮説や他の既存研究 (5) 等が我々の結果を支持している。

ミズナラでは、窒素付加に対して葉内の窒素濃度は上昇しているものの、その他の項目、特に防御においては一定の傾向が見られなかった。これは、青山ら (3) の処理 1 年目における、処理後 20 日までに防御が誘導され、30 日後には終息しているという傾向とは異なる結果が得られた。

これらの結果から、ブナは一斉開葉タイプであり、一度、葉を形成すると当年で新しい葉を出すことはほとんどな

いため、しっかりと恒常的な防御を施し、また食害が起こってから防御を誘導することによって葉を堅牢に防御していると考えた。逆に、ミズナラは条件が良いと 2 次フラッシュをするタイプであるので、当年の土壌の養分条件や食害の割合など周囲の環境に柔軟にตอบสนองし、防御を誘導するか誘導された防御も維持するか、当年で終息させるか、また防御を誘導しないかなどを決定し、より効率よく防御システムを運用していると考えた。

このように、樹種固有の成長特性によって誘導防御も樹種間で差がある可能性が示唆された。

今後の課題だが、ブナ・ミズナラともに長期的に恒常的な防御・誘導防御ともに追う必要があると考えている。本研究は実験開始から 2 年目の結果のみであるが、ミズナラのように 1 年目と 2 年目の結果が違うことはもちろん、防御は個体サイズに依存することも以前から知られている。従って、1 年間の経時変化だけでなく数年にもわたって防御の変化を追跡することにより、防御の実態に迫ることができると思われる。また、現在よく調べられている縮合タンニン量や総フェノール量のみならず、様々な防御物質や指標を調べることでさらに正確な知見を得ることができると考えている。

本研究を進めるに当たって科学研究費補助金・基盤研究 B (原田光・小池孝良) の支援を得た、記して感謝する。

引用文献

- (1) 青山千穂 (2009) 落葉広葉樹における誘導防御と開葉様式の関係. 北大農学部森林科学科, 平成 20 年度卒業論文
- (2) 青山千穂・小池孝良 (2009) 樹木の誘導防御に関する研究の動向と今後の方向性. 北方林業 61: 217-220.
- (3) 青山千穂・小池孝良 (2010) ブナ, ミズナラ幼樹の誘導防御の経時変化. 日林北支論 58: 143-146.
- (4) Björkman, C., Dalin, P. and Ahrne, K. (2008) Leaf trichome responses to herbivory in willows: induction, relaxation and costs. New Phytologist 179: 176-184.
- (5) 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.
- (6) Coly, P.D. (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. Oecologia 74: 531-536.
- (7) Karban, R. and Baldwin, I.T. (1997) Induced Responses to Herbivory. The University of Chicago Press, USA
- (8) Kimura, K., Ishida, A., Uemura, A., Matsumoto, Y. and Terashima, I. (1998) Effects of current-year and previous-year PFDs on shoot gross morphology and leaf properties in *Fagus japonica*. Tree Physiology 18: 459-466.

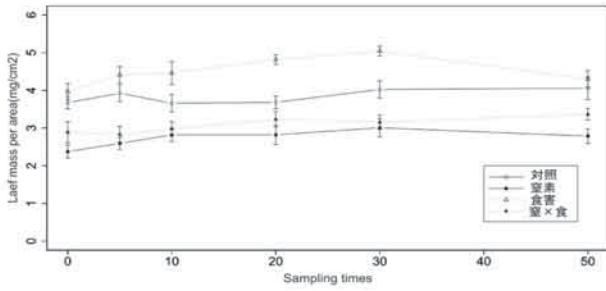


図 1-1 ブナの LMA (単位面積当たりの葉重量)

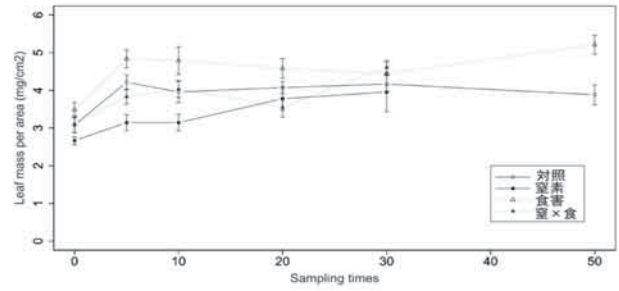


図 2-1 ミズナラの LMA (単位面積当たりの葉重量)

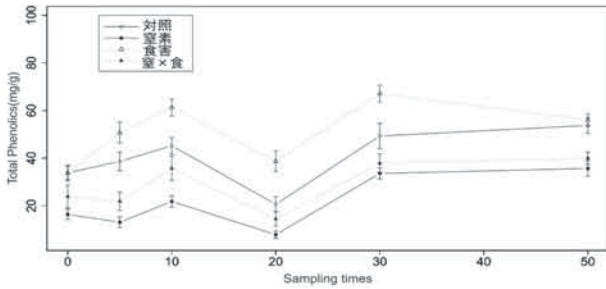


図 1-2 ブナの総フェノール量

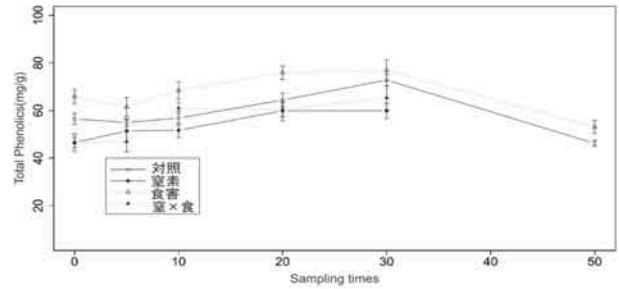


図 2-2 ミズナラの総フェノール量

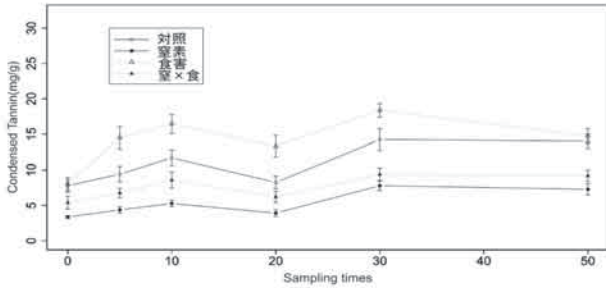


図 1-3 ブナの縮合タンニン量

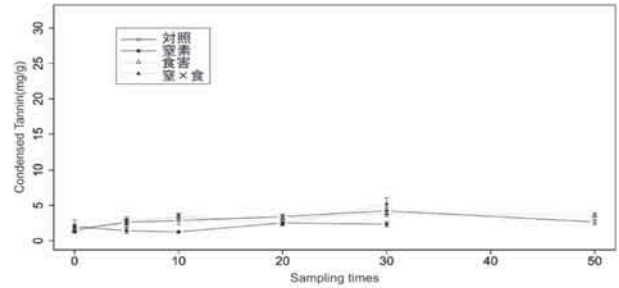


図 2-3 ミズナラの縮合タンニン量

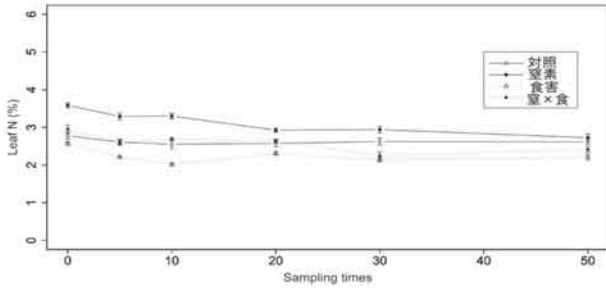


図 1-4 ブナの葉の窒素含有量

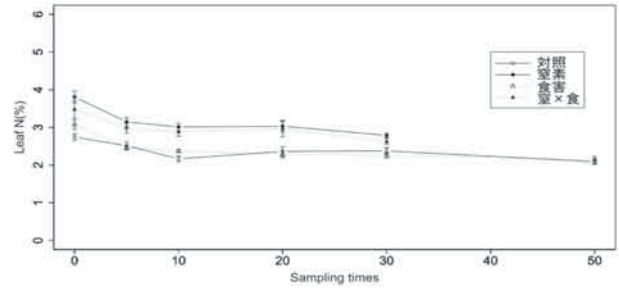


図 2-4 ミズナラの葉の窒素含有量

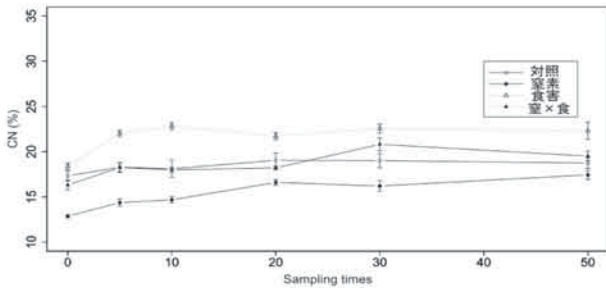


図 1-5 ブナの CN 比

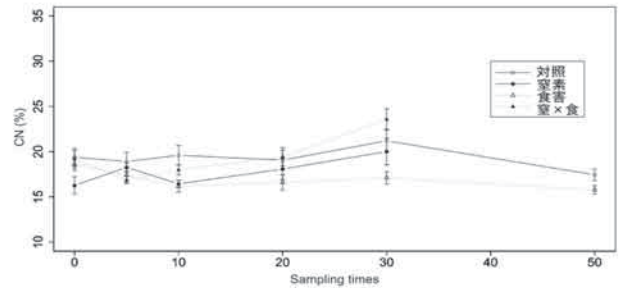


図 2-5 ミズナラの CN 比

すべての図で, n=12。
プロットは平均値。エラーバーは標準誤差。

表 1 図に関する Two-way ANOVA の統計結果。値は F 値 (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,n.s.p>0.1)。n=12。

| ブナ LMA | 0 日 | 5 日後 | 10 日後 | 20 日後 | 30 日後 | 50 日後 |
|-------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|--------------|
| 食害処理 | 5.0469(*) | 10.3794(**) | 28.068(***) | 65.99(***) | 38.966(***) | 6.1734(*) |
| 窒素処理 | 46.4643(***) | 163.0483(***) | 145.07(***) | 150.696(***) | 216.681(***) | 48.2432(***) |
| 食害×窒素 | 0.3949(n.s.) | 1.1483(n.s.) | 11.792(**) | 13.866(***) | 20.576(***) | 1.074(n.s.) |
| ミズナラ LMA | | | | | | |
| 食害処理 | 8.9574(**) | 16.1678(***) | 18.8701(***) | 0.9644(n.s.) | 4.9066(*) | 24.082(***) |
| 窒素処理 | 8.1799(**) | 40.5388(***) | 15.5482(***) | 11.6215(**) | 0.0109(n.s.) | |
| 食害×窒素 | 0.0142(n.s.) | 0.0492(n.s.) | 0.0194(n.s.) | 3.5809(n.s.) | 0.9067(n.s.) | |
| ブナ総フェノール量 | | | | | | |
| 食害処理 | 2.6192(n.s.) | 18.0143(***) | 35.0962(***) | 27.2234(***) | 15.4768(***) | 1.5413(n.s.) |
| 窒素処理 | 41.2745(***) | 121.4513(***) | 92.9814(***) | 53.4159(***) | 92.4407(***) | 41.8499(***) |
| 食害×窒素 | 2.8633(n.s.) | 0.4424(n.s.) | 0.1737(n.s.) | 5.4936(*) | 4.4359(*) | 0.1409(n.s.) |
| ミズナラ総フェノール量 | | | | | | |
| 食害処理 | 5.8656(*) | 0.2854(n.s.) | 24.2564(***) | 5.2653(*) | 2.5342(n.s.) | 12.18(**) |
| 窒素処理 | 42.1863(***) | 7.2567(*) | 8.294(**) | 11.484(**) | 16.8545(***) | |
| 食害×窒素 | 4.4357(*) | 2.638(n.s.) | 0.2737(n.s.) | 3.444(n.s.) | 0.0558(n.s.) | |
| ブナ縮合タンニン量 | | | | | | |
| 食害処理 | 3.3451(n.s.) | 29.1674(***) | 44.8582(***) | 30.7046(***) | 15.1683(***) | 2.7775(n.s.) |
| 窒素処理 | 36.0671(***) | 79.4045(***) | 139.0689(***) | 66.5939(***) | 105.6931(***) | 64.3778(***) |
| 食害×窒素 | 2.1283(n.s.) | 3.6628(n.s.) | 1.3615(***) | 4.2304(*) | 2.8588(n.s.) | 0.5533(n.s.) |
| ミズナラ縮合タンニン量 | | | | | | |
| 食害処理 | 0.1574(n.s.) | 2.9911(n.s.) | 9.7271(**) | 0.6099(n.s.) | 4.5703(*) | 13.666(**) |
| 窒素処理 | 1.697(n.s.) | 5.8482(*) | 2.7054(n.s.) | 6.0439(*) | 0.309(n.s.) | |
| 食害×窒素 | 0.0156(n.s.) | 1.2319(n.s.) | 5.3995(*) | 0.066(n.s.) | 11.9652(**) | |
| ブナ葉の窒素含有量 | | | | | | |
| 食害処理 | 38.823(***) | 52.9389(***) | 151.7891(***) | 47.5496(***) | 61.5145(***) | 22.8284(***) |
| 窒素処理 | 89.452(***) | 58.0739(***) | 238.843(***) | 72.9134(***) | 9.416(**) | 3.9329(n.s.) |
| 食害×窒素 | 9.993(**) | 3.8209(n.s.) | 0.6887(n.s.) | 0.0776(**) | 1.8874(n.s.) | 0.3374(n.s.) |
| ミズナラ葉の窒素含有量 | | | | | | |
| 食害処理 | 0.1722(n.s.) | 1.578(n.s.) | 1.2213(n.s.) | 0.5892(n.s.) | 8.1003(**) | 0.4385(n.s.) |
| 窒素処理 | 41.3953(***) | 50.6342(***) | 164.4265(***) | 49.9271(***) | 64.5683(***) | |
| 食害×窒素 | 8.4484(**) | 0.4308(n.s.) | 10.154(**) | 0.000005527(n.s.) | 0.2201(n.s.) | |
| ブナ CN | | | | | | |
| 食害処理 | 58.86(***) | 101.8591(***) | 177.8167(***) | 73.0447(***) | 59.1282(***) | 20.8144(***) |
| 窒素処理 | 144.026(***) | 105.6092(***) | 180.5593(***) | 133.8385(***) | 19.9151(***) | 10.0156(**) |
| 食害×窒素 | 17.459(***) | 0.0337(n.s.) | 5.3351(*) | 4.4778(*) | 1.0209(n.s.) | 1.4107(n.s.) |
| ミズナラ CN | | | | | | |
| 食害処理 | 5.9467(*) | 7.5634(*) | 10.5167(**) | 4.0011(n.s.) | 1.0001(n.s.) | 9.1591(**) |
| 窒素処理 | 14.4278(***) | 1.2133(n.s.) | 2.8836(n.s.) | 4.854(*) | 10.2615(**) | |
| 食害×窒素 | 29.0601(***) | 0.0072(n.s.) | 37.6873(***) | 21.1216(***) | 21.4984(***) | |