

短期間の土壤乾燥ストレスに対するブナの当年生実生の根系における遊離プロリンと総フラボノイドの濃度変化

青 日菜子¹, 鳥丸 猛^{1*}, 赤路 康朗², 赤田 辰治³, 松田 陽介¹, 木佐貫博光¹

¹ 三重大学大学院生物資源学研究科

² 国立環境研究所

³ 弘前大学農学生命科学部

Free-proline and Total Flavonoid Responses in Roots of *Fagus crenata* Current-year Seedlings to Short-term Soil Drought Stress

Hinako AO¹, Takeshi TORIMARU^{1*}, Yasuaki AKAJI², Shinji AKADA³,

Yosuke MATSUDA¹ and Hiromitsu KISANUKI¹

¹ Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577, Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

² National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

³ Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, 3 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan

Abstract

To examine effects of soil drought stress on the production of potentially stress-related compounds in current-year seedlings of *Fagus crenata*, we collected seeds from two sites in the northern region of mainland in Japan. We then germinated and grew them in well-watered (watered once every two days) or water-stressed (no watering) conditions in an environmental chamber for ca. two weeks. The concentrations of biochemical compounds in roots were estimated to be in the range 0.31–0.76 $\mu\text{mol/gDW}$ and 0.51–0.61 mg/gDW for free-proline and total flavonoids, respectively. Negative associations were found between the seedlings' height at the start of the experiment and concentrations of free-proline but not total flavonoids in roots. After accounting for the effect of height, there was no significant difference between the two sites with respect to the concentrations of free-proline and total flavonoids in roots of seedlings. Regardless of biomolecules examined, the concentrations in roots of seedlings did not increase by the treatment of water-stress. Rather, in the seedlings from one site, it was found that the concentration of free-proline in roots was higher in the well-watered than in water-stressed conditions. These results suggest that there is a trade-off between the concentrations of free-proline in roots and the beech seedling size, whereas it is necessary to examine the relationship between the concentration of each flavonoid species and the seedling size. The water-stressed conditions in this study might have not been intense enough to drive the differences in the concentration of total flavonoids between seedlings from different experimental conditions. It was speculated that proline catabolism involves in the reduction of the concentration of free-proline in roots of the beech seedlings found in our water-stressed condition.

Key Words: *Fagus crenata*, free-proline, root, soil drought, total flavonoids

2024年3月19日受理

¹ 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町1577

² 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2

³ 〒036-8561 青森県弘前市文京町3

* For correspondence (e-mail: torimaru@bio.mie-u.ac.jp)

1. はじめに

ブナ (*Fagus crenata*) は、日本の冷温帯域に広く分布する落葉広葉樹林の優占樹種である。ブナ林は、水源涵養機能や野生生物の生息地として近年では重要性が再認識されてきている¹⁾。しかし、将来予測される気候シナリオに基づく、100年後には現在のブナの分布適域が九州、四国、本州太平洋側ではほとんど消滅し、現在は分布適域の広い東北地方でも大きく減少すると予測されている¹⁾。このブナ林衰退の原因として、気候の温暖化によって土壌水分の蒸発量が増加するために土壌が乾燥化し²⁾、それが植物へストレス（以降、乾燥ストレス）となることが考えられる。特に、実生は環境ストレスに対して脆弱であること³⁾を考慮すると、個体群の維持や存続を予測する上で、実生の乾燥ストレスへの応答の実態の解明は必要と考えられる。また、近年では、地球規模の気候変動によって短期間に顕著な環境変化が生じる頻度が増大している⁴⁾。この環境変化は将来も予想されており、例えば無降雨期間が生じる頻度の増加によって乾燥による樹木の衰退・枯死が世界的に懸念されている⁵⁾。したがって、将来の気候変動下におけるブナの個体群の存続可能性を検討する上で、ブナの実生の乾燥ストレスへの迅速な応答の評価は重要な課題と考えられる。

植物は、生育場所の土壌の乾燥化に対して順化する能力を備えている。例えば、乾燥ストレスを受けた植物体内では、細胞の膨圧を維持するために、プロリン、グリシンベタイン、ポリオールなどの浸透圧調節物質が新たに生産され、細胞内に蓄積されることで細胞浸透圧が上昇し、細胞内への水の流入が促進される^{6)~8)}。特に、遊離プロリンは代表的な浸透圧調節物質であり、樹木が乾燥ストレスに曝されると葉や根に蓄積される現象が多く報告されており^{9)~11)}、それらは乾燥ストレスに対して順化する能力として認識されている⁶⁾。また、植物は乾燥などの環境ストレスを受けると活性酸素種を過剰に生成する¹²⁾。この活性酸素種は、反応性に極めて富んだ酸素の分子種であり、タンパク質や脂質などの生体物質と反応して細胞に損傷を与える¹³⁾。乾燥ストレス下の樹木では、葉や根の総フラボノイド量が増加することが知られ^{14, 15)}、フラボノイド類のいくつかの分子種は、

活性酸素を除去することによって乾燥ストレスに対する耐性獲得に貢献する¹⁶⁾。一方、植物種内において、乾燥ストレスに対して生体物質の濃度は一様に増加するとは限らない。例えば、生体物質の濃度が変化しない集団や遺伝子型の個体が認められる場合、または異なる機能を示す生体物質は乾燥ストレスに対する濃度の変化パターンが異なる場合が報告されている^{9, 14)}。したがって、複数の産地や異なる機能を示す浸透圧調節物質や抗酸化物質などの生体物質を対象に乾燥ストレスに対する濃度変化を調査することで、樹種の乾燥ストレスへの順化能力の実態への理解が深まると考えられる。

ブナ当年生実生の葉については、苗高が低い個体ほど遊離プロリンおよび総フラボノイドの濃度が高かった¹⁷⁾。さらに、苗高の影響を考慮したところ、葉中の遊離プロリン濃度は乾燥ストレス条件下で生育した当年生実生で高かったが、葉中の総フラボノイドは乾燥ストレスによる濃度の変化は認められなかった¹⁷⁾。これらの結果から、遊離プロリンがブナ当年生実生の葉における短期間の乾燥ストレスに対する迅速な順化反応に関与していることが示唆された。しかし、乾燥ストレスに対するブナ当年生実生の根系の応答は明らかにされていない。そこで本研究では、ブナの当年生実生を短期間の土壌の乾燥処理実験に供し、当年生実生の根系の遊離プロリンと総フラボノイドの濃度を測定した。そして、本研究では、(I) 植物体のサイズ（苗高）が当年生実生の根系の遊離プロリンと総フラボノイドの濃度に影響を及ぼすか、(II) 乾燥処理によって当年生実生の根系の遊離プロリンと総フラボノイドの濃度が変化するか、検証することを目的とした。

2. 材料と方法

1. 試料採集と栽培実験

本研究では、乾燥ストレスに対するブナ当年生実生の葉の応答を解明することを目的として育成された個体¹⁷⁾を用いた。ブナ種子の採取、当年生実生の栽培と処理実験の概要は以下の通りである。2020年9月、青森県内の天然林において、互いに約40 km離れた二か所〔白岩森林公園（北緯40度34分、東経140度39分、標高285.0 m、

以降、白岩)と高倉森(北緯40度54分, 東経140度16分, 標高829.3 m)]でブナの母樹1本から種子を採取した。採取した種子は湿らせた水苔に包んだ後, ジップロックに入れ, 遮光した冷蔵庫(庫内温度1~2°C)内で保管した。2021年3月23日と2021年4月1日に, ポリポット(口径12~13 cm × 高さ10~11 cm)に培土[バーミキュライト(蛭石): 培養土(ヤシガラ繊維、焼土、バーク堆肥、腐葉土など) = 1:1)を約8分目まで入れ, 種子を播種した。播種後, 2日に1回, 1ポット当たり100 mLの給水を行った。2021年4月28日, 本葉2枚が完全に展開した当年生実生を無作為に選び(白岩: 12個体, 高倉森: 12個体), 樹高を測定した。その結果, 処理実験開始時の当年生実生の樹高は, 採種地内の処理区間や処理区内の採種地間で有意な差は認められないことが確認されている¹⁷⁾。次に, 恒温室(LP-1.9P-S, 日本医化機械製作所)に設置した照明育成棚において, 対照区と処理区に分けて処理実験を開始した(各産地の各実験区に6個体の当年生実生を使用した)。処理実験を行った恒温室の温度は午前6時から午後6時までを25°C, 午後6時から翌日の午前6時までを15°Cに設定した。また, 午前6時から午後8時まで照明を点灯し, 午後8時から翌日の午前6時まで消灯して暗室となるように設定した。点灯時の光合成有効波長域(400~700 nm)の光量子束密度は約135~190 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ [光量子計MQ-100(藤原製作所)で計測]であった。対照区では2日に1回, 1ポット当たり100 mLの給水を行い, 処理区では連日給水を停止した。ポットの位置は2日に1回ランダムに移動させた。処理実験開始直前に土壌水分計(Lutron PMS-714, 台湾)で相対土壌水分量を計測し, 処理区の相対土壌水分量が処理実験開始直前の約1/3にまで減少した時点で実験を終了した[白岩: 18日間(2021年4月28日~5月16日), 高倉森: 15日間(2021年4月28日~5月13日)]。処理実験最終日の13~15時頃に, 根系全体(以下、根系)を採取した。採取された根系は, ただちに液体窒素で凍結させた後, -85°Cで保存した。

2. 成分分析

根系全体に含まれる遊離プロリンとフラボノイドの濃度を以下の方法によって推定した。はじめ

に, 前処理として乳鉢と乳棒を用いて液体窒素下で試料を粉末化し, その後80%エタノールによる抽出を2回, ならびに50%エタノールによる抽出を1回実施し, 成分抽出液とした。根系の遊離プロリンの濃度を測定するために, ニンヒドリン法¹⁸⁾を用いて成分抽出液を発色させ, 可視分光光度計(ASV11D, アズワン)を用いて波長520 nmにおける吸光度を測定した。プロリン溶液(0.5 mM, 1 mM, 2 mM)と蒸留水(0 mM)を使用して検量線を作成した。同様に, 根系の総フラボノイドの濃度を測定するために, 塩化アルミニウム法¹⁹⁾を用いて成分抽出液を発色させ, 波長415 nmにおける吸光度を測定した。ケルセチン溶液(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と蒸留水(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を使用して検量線を作成した。そして, 以上の方法で測定された成分抽出液の濃度に基づいて, 生重1 gの根系に含まれる遊離プロリンと総フラボノイドの重量を推定した。なお, 成分抽出液の濃度は1サンプルあたり3回測定し, それらの数値を平均した値を個体の代表値として以降の統計分析に使用した。次に, 根系全体の生重と乾重の比を算出し, 乾量あたりの生体物質の濃度を推定した²⁰⁾。そのために, 別途育成した対照区と処理区の当年生実生を5個体ずつ採取して根系全体の生重を計測するとともに, それらを80°Cで72時間乾燥させて乾重を計測した(附表)。

3. 統計分析

乾燥処理がブナ当年生実生の根の遊離プロリンと総フラボノイドの物質質量へ及ぼす影響を分析するために, 線形予測子とリンク関数(f)に基づいて応答変数の期待値 $[E(Y)]$ を推定する一般化線形モデル(Generalized Linear Model, GLM)を構築した。

$$\begin{aligned} \ln[E(Y)] = & \beta_{\text{切片}} + \beta_{\text{樹高}} \times \ln(\text{樹高}) + \beta_{\text{処理区}} \times \text{処理区} + \\ & \beta_{\text{採種地}} \times \text{採種地} + \beta_{\text{交互作用}} \times \text{処理区} \times \text{採種地} \end{aligned}$$

ここで, 説明変数は処理区(対照区=0, 乾燥処理区=1), 採種地(白岩森林公園=0, 高倉森=1), そして処理区と採種地の交互作用とした。誤差構造はガンマ分布に従い, リンク関数(f)は対数関数とした。また, 一般的に生理現象の環境応答が個体サイズに依存する可能性が考えられるため, GLMの説明変数に処理実験開始時の樹高を対数変換した値を加えた(係数 $\beta_{\text{樹高}}$ を追加)。

GLMの説明変数の係数(β)をベイズ推定し, そのためのサンプリング計算にはマルコフ連鎖モンテカルロ法(以下, MCMC)を用いた。1回のMCMCのシミュレーションでは, 5000回の繰り返し計算期間から稼働検査期間(3000回)を除いた期間について, 2ステップごとにパラメータを抽出して標本時系列を生成した。このシミュレーションを5回行い, 各係数の推定値(平均値)と95%信用区間を算出した。そして, 95%信用区間に0を含まない場合, 乾燥処理, あるいは採種の違いによる有意な差が認められるものとした²¹⁾。また, 事後分布の収束判定として $\hat{R}^{22)}$ を算出し, 1.1未満²³⁾であることを確認した。

以上の解析には, R 4.1.1²⁴⁾, およびRパッケージジRStan²⁵⁾とbrms²⁶⁾を使用した。

3. 結果と考察

本研究で測定したブナ当年生実生の根系全体の遊離プロリン濃度の平均値は, 0.15~0.24 $\mu\text{mol/g}$ Fresh Weight (以降gFW)であった(表-1)。また, 根系全体の生重と乾重の比から推定された乾重当たりの遊離プロリン濃度は, 0.31~0.76 $\mu\text{mol/g}$ Dry Weight (以降gDW)(図-1)となり, ヨーロッパバクリ(*Castanea sativa*, ブナ科)の接ぎ木された二年生の幼苗(台木は同じ樹種)における細根の

表-1 ブナ当年生実生の根系全体の生重1g中の遊離プロリン(a)と総フラボノイド(b)の濃度(平均±標準誤差)

(a)		
産地	遊離プロリン ($\mu\text{mol/gFW}$)	
産地	処理区	
白岩	0.24 ± 0.03 (n = 6)	0.15 ± 0.02 (n = 6)
高倉森	0.18 ± 0.02 (n = 6)	0.18 ± 0.01 (n = 6)
(b)		
総フラボノイド ^d (mg/gFW)		
産地	処理区	
白岩	0.17 ± 0.02 (n = 6)	0.24 ± 0.01 (n = 6)
高倉森	0.20 ± 0.02 (n = 6)	0.28 ± 0.03 (n = 6)

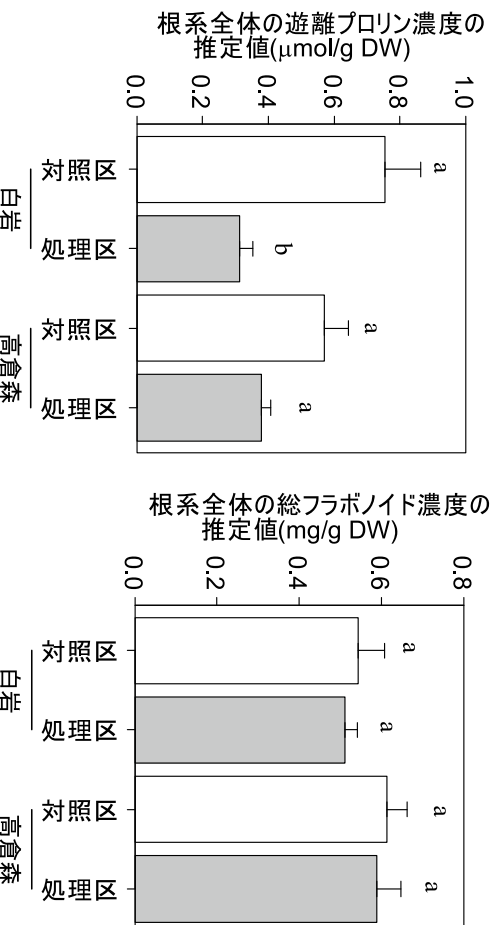


図-1 ブナ当年生実生の根系の遊離プロリン(左)と総フラボノイド(右上)の濃度

白棒: 対照区, 灰棒: 処理区。エラーバーは標準誤差を表す。白岩・対照区: n = 6, 白岩・処理区: n = 6, 高倉森・対照区: n = 6, 高倉森・処理区: n = 6。有意差の有無は, GLMの係数の推定値の95%信用区間に基づき(本文を参照)。産地内における異なる小文字のアルファベットは, 対照区と処理区間の有意差を示す。

濃度 (0.69~6.08 $\mu\text{mol/gDW}$) 範囲と重複していた²⁶⁾。一方、本研究で測定した根系全体の総フラボノイド濃度の平均値は、0.17~0.28 mg/gFWであった (表-1)。また、乾重当たりの総フラボノイド濃度は、0.51~0.61 mg/gDWとなり、シロバナワタ (*Gossypium herbaceum*, アオイ科) の根系で計測された濃度 (0.47 mg/gDW) と同程度であった²⁷⁾。以上のように既往の研究報告との比較から、本研究における根系における遊離プロリンと総フラボノイドの濃度の推定値は妥当な範囲内にあることが示唆された。

実験区に関わらず、処理実験開始時の当年生実生の樹高が低いほど処理実験終了時の根の遊離プロリンの濃度は高かった (表-2)。本研究の処理で得られた地上部側の応答では¹⁷⁾、ブナ当年生実生の苗高が高いほど葉の遊離プロリンの濃度は低下していたことが報告されており、プロリンの生合成量と体サイズ間のトレードオフが指摘されている。このトレードオフが根系全体の遊離プロリン濃度の個体差にも反映されている可能性が考えられる。一方、総フラボノイドの濃度は、当年生実生の苗高とは関連性が認められず (表-2)、ブナ当年生実生の苗高が高いほど葉の総フラボノイドの濃度が高くなった報告¹⁷⁾と異なった。フラボノイド類の生合成酵素をコードする *CHALCONE*

SYNTHASE (CHS) などの遺伝子は光に依存して発現するため、根ではフラボノイド類は生合成されず、シュートで生合成されたフラボノイド類が根に輸送されることが知られている^{28, 29)}。さらに、フラボノイド類の分子種は、その種類に応じて植物体内をある器官から別の器官へと選択的に輸送されることが報告されており、フラボノイド類の植物体内の分布は生合成された部位から受動的に拡散して形成されるものではない可能性が指摘されている³⁰⁾。以上の報告をふまえると、ブナ当年生実生の苗高がフラボノイド類の根系への蓄積に及ぼす影響をより詳細に理解するためには、今後、フラボノイド類の分子種ごとに濃度を測定する必要がある。

本研究で推定された根系全体の総フラボノイドの濃度は、産地や実験区の間で有意な差は認められなかった (図-1, 表-2)。乾燥などの環境ストレスにさらされた植物では細胞を傷つける活性酸素が発生するが、一方で植物は活性酸素を除去する物質を生成することが知られている¹²⁾。その際、スーパーオキシドディスムターゼなどの酵素がはじめに活性酸素の除去に働くが、より厳しい乾燥ストレスにより酵素の活性が低下した場合にのみ、フラボノイド類などの非酵素系物質が生成され活性酸素を除去することが示唆されている^{31, 32)}。コ

表-2 ブナ当年生実生の根系全体における乾燥重量あたりのプロリンの濃度 (上段) とフラボノイドの濃度 (下段) を応答変数とする一般化線形モデルの係数

根系全体のプロリン濃度			
係数	推定値	95%信用区間	\hat{R}
β 切片	-0.36	(-0.58, -0.13)	1.00
β 樹高	-0.16	(-0.28, -0.03)	1.00
β 処理区	-0.81	(-1.13, -0.49)	1.00
β 採種地	-0.24	(-0.55, 0.07)	1.00
β 交互作用	0.54	(0.11, 0.98)	1.00

根系全体のフラボノイド濃度			
係数	推定値	95%信用区間	\hat{R}
β 切片	-0.60	(-0.78, -0.4)	1.00
β 樹高	0.03	(-0.08, 0.14)	1.00
β 処理区	-0.07	(-0.33, 0.21)	1.00
β 採種地	0.12	(-0.16, 0.39)	1.00
β 交互作用	0.00	(-0.38, 0.39)	1.00

ナラ属の一種 (*Quercus brantii*, ブナ科) の苗木を、対照区 (土壌圃場容積の 100% の水分状態)、中程度の乾燥処理区 (土壌圃場容積の 40% の水分状態)、強度の乾燥処理区 (土壌圃場容積の 20% の水分状態) に分けて 3 か月間にわたって栽培した研究では、葉のスーパーオキシドディスムターゼ活性は中程度および強度の乾燥処理区で有意に高かったが、フラボノイド濃度は強度の乾燥処理区でのみ有意に高かった¹⁴⁾。以上をふまえると、本研究で実施した相対土壌水分量を約 1/3 まで減少させた短期間の乾燥処理は、フラボノイド類を含む非酵素系物質が生成されるほどの厳しい乾燥ストレスではなかった可能性が考えられた。

根系全体の遊離プロリンの濃度は産地間で有意な差は認められず、また産地に関わらず乾燥処理によっても濃度は上昇しなかった (図 -1, 表 -2)。むしろ、白岩産のブナ当年生実生では、乾燥処理によって遊離プロリンの濃度が低下していた (図 -1)。その要因の一つとして、根系で遊離プロリンの分解が生じた可能性が考えられる。若い根は古い根よりも効率的に水を取り込むことができるため、乾燥ストレスにさらされた樹木は根の脱落と根系の再成長を行う³³⁾。この再成長の一つである側根の成長にはプロリンの異化により生成されるグルタミン酸が関与することが報告されている³⁴⁾。そのため、本研究の乾燥処理によりブナ当年生実生の根系では、遊離プロリンがグルタミン酸に異化されて、側根の成長に利用されていたのかもしれない。

以上から本研究では、苗高の高いブナ当年生実生に根系全体の遊離プロリンの濃度の低下が認められ、体サイズとプロリンの生合成量の間のトレードオフが示唆された。また、短期間の乾燥処理に対してブナ当年生実生の根系における総フラボノイドの濃度は有意に変化しなかったため、今後、より強度もしくは長期間の乾燥ストレス下における根系のフラボノイド類の濃度を測定する必要があると考えられた。さらに、根系全体の遊離プロリンの濃度はむしろ処理区で高くなる産地が認められた。乾燥ストレス下において根系で遊離プロリンの異化が生じている可能性が考えられたが、今後、根系におけるプロリンの異化に関わる遺伝子の発現を処理区間で比較し、その実態を把握する必要がある。

謝 辞

本研究の調査と成分分析は科学研究補助金 (20K06124) によって支援された。

要 約

土壌への乾燥ストレスがブナの当年生実生の根系における生体物質の濃度へ及ぼす影響を明らかにするため、青森県の 2 箇所 (白岩と高倉森) でブナから採種し、発芽させて恒温室内で約 2 週間にわたり対照区 (2 日に 1 回給水) と乾燥処理区 (給水無し) に分けて栽培した。その結果、処理実験開始時に苗高が低い個体ほど処理実験終了時の根系全体の遊離プロリンの濃度が高かったが、総フラボノイドの濃度は苗高と関連性は認められなかった。産地に関わらず、当年生実生の根系全体の遊離プロリンと総フラボノイドの濃度は、対照区よりも処理区で増大することはなかった。むしろ、白岩産のブナ当年生実生では、処理区よりも対照区で根系全体の遊離プロリン濃度は高かった。以上から、根系全体における遊離プロリンの濃度は体サイズとトレードオフの関係にあることが示唆されるものの、フラボノイド類については分子種ごとに濃度を測定し、苗高との関係性を調査する必要があると考えられた。本研究の乾燥処理は、実験区間の総フラボノイドの濃度に差を生じさせるほどの強度ではなかった可能性が考えられた。また、乾燥ストレスによって本研究で用いたブナ当年生実生の根系においてプロリンの異化が生じた可能性が推測された。

引用文献

- 1) 田中信行, 松井哲也, 八木橋勉, 埴田宏: 天然林の分布を規定する気候要因と温暖化の影響予測: とくにブナ林について. 地球環境, **11**, 11-20 (2006)
- 2) 守利悟朗, 篠田成郎: 地球温暖化による森林土壌乾燥化及び超微細土粒子融解過程のモデル化. 水工学論文集, **49**, 1045-1050 (2005)
- 3) Leck, M.A., R.L. Simpson, V.T. Parker: Why seedlings? In: Leck MA, Parker VT, Simpson RL (eds) Seedling ecology and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p.3-12 (2008)
- 4) Hoffmann, A.A., C.M. Sgro: Climate change and

- evolutionary adaptation. *Nature*, **470**, 479–485 (2011)
- 5) Allen, C.D., A.K. Macalady, H. Chenchouni, D. Bachelet, N. McDowell, M. Vennetier, T. Kitzberger, A. Rigling, D.D. Breshears, E.H. Hogg, P. Gonzalez, R. Fensham, Z. Zhang, J. Castro, N. Demidova, J. Lim, G. Allard, S.W. Running, A. Semerci, N. Cobb: A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For. Ecol. Manage.*, **259**, 660–684 (2010)
 - 6) Ashraf, M., M.R. Foolad: Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.*, **59**, 206–216 (2007)
 - 7) Kishor, P.B.K., S. Sangam, R.N. Amrutha, P.S. Laxmi, K.R. Naidu, K.R.S.S. Rao, S. Rao, K.J. Reddy, P. Theriappan, N. Sreenivasulu: Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth an abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.*, **88**, 424–438 (2005)
 - 8) Williamson, J.D., D.B. Jennings, W.W. Guo, D.M. Pharr, M. Ehrenshaft: Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection? *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **127**, 467–473 (2002)
 - 9) Amrutha, S., A.B.M. Parveen, M. Muthupandi, K. Vishnu, S.S. Bisht, V. Sivakumar, M.G. Dasgupta: Characterization of *Eucalyptus camaldulensis* clones with contrasting response to short-term water stress response. *Acta Physiol. Plant.*, **43**, 1–13 (2021)
 - 10) Aranda, I., D. Sanchez-Gomez, E. Cadahia, B.F. Simón: Ecophysiological and metabolic response patterns to drought under controlled condition in open-pollinated maternal families from a *Fagus sylvatica* L. population. *Environ. Exp. Bot.*, **150**, 209–221 (2018)
 - 11) Sofo, A., B. Dichio, C. Xiloyannis, A. Masia: Lipoxigenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiol. Plant.*, **121**, 58–65 (2004)
 - 12) 山内靖雄：酸化ストレス応答に関わる新たなプレイヤー：活性カルボニル。植物の生長調節, **49**, 143–148 (2014)
 - 13) Karuppanapandian, T., J.C. Moon, C. Kim, K. Manoharan, W. Kim: Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust. J. Crop Sci.*, **5**, 709–725 (2011)
 - 14) Jafarnia, S., M. Akbarinia, B. Hosseinpour, S.A.M. Modarres Sanavi, S.A. Salami: Effect of drought stress on some growth, morphological, physiological, and biochemical parameters of two different populations of *Quercus brantii*. *iForest*, **11**, 212–220 (2018)
 - 15) Mechri, B., M. Tekaya, M. Hammami, H. Chehab: Root verbascoside and oleuropein are potential indicators of drought resistance in olive trees (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, **141**, 407–414 (2019)
 - 16) Nakabayashi, R., K. Yonekura-Sakakibara, K. Urano, M. Suzuki, Y. Yamada, T. Nishizawa, F. Matsuda, M. Kojima, H. Sakakibara, K. Shinozaki, A.J. Michael, T. Tohge, M. Yamazaki, K. Saito: Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J.*, **77**, 367–379 (2014)
 - 17) Ao, H., T. Torimaru, Y. Akaji, S. Akada, Y. Matsuda, H. Kisanuki: Free-proline and total flavonoid responses in leaves of *Fagus crenata* current-year seedlings to short-term soil drought stress. *Sylwan*, **167**, 26–36 (2023)
 - 18) Bates, L.S., R.P. Waldren, I.D. Teare: Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, **39**, 205–207 (1973)
 - 19) Kiranmai, M., C.B.M. Kumar, M. Ibrahim: Comparison of total flavanoid content of *Azadirachta indica* root bark extracts prepared by different methods of extraction. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, **2**, 254–261 (2011)
 - 20) Forlani, G., M. Bertazzini, G. Cagnano: Stress-driven increase in proline levels, and not proline levels themselves, correlates with the ability to withstand excess salt in a group of 17 Italian rice genotypes. *Plant Biol.*, **21**, 336–342 (2019)
 - 21) Torimaru, T., Y. Takeda, M. Matsushita, I. Tamaki, J. Sano, N. Tomaru: Family-specific responses in survivorship and phenotypic traits to different light environments in a seedling population of *Fagus crenata* in a cool-temperate forest. *Popul. Ecol.*, **57**, 77–91 (2015)
 - 22) Gelman, A., D.B. Rubin: Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat. Sci.*, **7**, 457–472 (1992)
 - 23) Burkner, P.C.: brms: An R package for bayesian multilevel models using Stan. *J. Stat. Softw.*, **80**, 1–28 (2017)
 - 24) R Development Core Team: The R Project for

- Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2021)
- 25) Stan Development Team: RStan: the R interface to Stan. R package version 2.21.2. (2020)
- 26) Camisón, Á., M.Á. Martín, V. Flors, P. Sánchez-Bel, G. Pinto, M. Vivas, V. Rolo, A. Solla: Exploring the use of scions and rootstocks from xeric areas to improve drought tolerance in *Castanea sativa* Miller. *Environ. Exp. Bot.*, **187**, 104467 (2021)
- 27) Patel, M., R.P. Mishra: Estimation of total phenol and flavonoids contents of *Gossypium herbaceum*. *World J. Pharm. Res.*, **7**, 1615–1622 (2018)
- 28) Buer, C.S., G.K. Muday, M.A. Djordjevic: Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **145**, 478–490 (2007)
- 29) Jenkins, G.I., J.C. Long, H.K. Wade, M.R. Shenton, T.N. Bibikova: UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, **151**, 121–131 (2001)
- 30) Buer, C.S., G.K. Muday, M.A. Djordjevic: Implications of long-distance flavonoid movement in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.*, **3**, 415–417 (2008)
- 31) Baskar, V., R. Venkatesh, S. Ramalingam: Flavonoids (antioxidants systems) in higher plants and their response to stresses. *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*, p.253–268 (2018)
- 32) Fini, A., C. Brunetti, M. Ferdinando, F. Ferrini, M. Tattini: Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signal. Behav.*, **6**, 709–711 (2011)
- 33) Brunner, I., C. Herzog, M.A. Dawes, M. Arend, C. Sperisen: How tree roots respond to drought. *Front. Plant Sci.*, **6**, 547 (2015)
- 34) Forde, B.G., P.J. Lea: Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J. Exp. Bot.*, **58**, 2339–2358 (2007)

付表 対照区と処理区におけるブナ当年生実生の根系全体の乾燥重量 / 生重量比 (平均 ± 標準誤差)

	対照区	処理区
乾燥重量 / 生重量比	0.321 ± 0.001 (<i>n</i> = 5)	0.473 ± 0.012 (<i>n</i> = 5)