

Short Report

クロロフィル蛍光測定によるアスナロ属 (genus *Thujaopsis*) 植物群の耐凍性

獲得過程の推定

稲永路子¹, 高田克彦²

¹ 国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所林木育種センター

² 秋田県立大学木材高度加工研究所

ヒノキ科アスナロ属は日本の固有属で、アスナロとヒノキアスナロの2変種が含まれ、分類学上ではアスナロが南方変種、ヒノキアスナロが北方変種として位置付けられている。両変種は冬季の環境に適応する過程で生理学的に異なる形質に分化してきた可能性があることから、生理学的形質の一つである耐凍性を測定することで変種間の分化について検証できるかもしれない。そこで本研究では、アスナロ属の耐凍性獲得過程の推定におけるクロロフィル蛍光測定の有効性を評価することを目的とした。全国の15産地に由来するアスナロ属の葉組織を2016年9月から2017年2月にかけて採取し、0から-30℃までの低温処理を行った後、クロロフィル蛍光の指標である F_v/F_m を測定した。結果、低温障害が開始する直前の閾値(転換温度)は秋から冬への季節変化に対応して低下し、低下パターンには明確な個体差が見られた。したがって、 F_v/F_m および転換温度をアスナロ属葉組織の耐凍性の指標として使用できると考えられる。

キーワード: アスナロ属, 耐凍性, クロロフィル蛍光測定, F_v/F_m

低温への適応は、冬季に気温が大幅に下がる温帯以北に分布する多年生植物、特に生存期間が長いために繰り返し冬を経験する樹木にとって生存に必須の能力である。夏から冬にかけて、植物は徐々に低温ストレスへの耐性を高めていくが、この過程を低温順化と呼ぶ(酒井, 1995)。中でも0℃未満の低温に対する抵抗性のことを耐凍性と言う。

細胞内に氷晶が形成される細胞内凍結は致死的原因であるため(藤川, 1996)、耐凍性を獲得した植物は細胞内凍結を回避する戦略をとっている。植物が凍結温度に遭遇した時の適応戦略の一つに、細胞外凍結がある(上村, 2014)。細胞外凍結は、気温が氷点下になると氷晶が細胞内ではなく細胞外(細胞間隙)に形成される現象である。細胞内の水が徐々に細胞外に移動して凍結するため、細胞は氷晶による破壊を免れるが、一方で脱水ストレスや細胞内の溶質濃

度が高くなることによる塩および浸透ストレスにさらされる。さらに、強い脱水の影響で膜表層に存在する水分子が除去され、細胞膜と細胞内膜系(葉緑体包膜や液胞膜など)が相互作用して膜の独立性が失われ、結果細胞が死に至る危険性がある(上村ら, 2009; 上村, 2014)。このため、植物細胞が耐えられる範囲以上の低温に遭遇すると葉緑体も障害を受けると考えられる。したがって、葉緑体の膜組織の状態を継時的に追跡することで、植物が受ける凍結障害の状態を推定できると考えられる。

クロロフィル蛍光測定は、非侵襲的かつ簡単に光化学系II(photosystem II: 以下, PSII)の状態を定量できる手法である(Mishra *et al.*, 2011; 園池, 2008)。PSIIを構成する主要なタンパク質複合体は葉緑体チラコイド膜上に存在するため、低温によって葉緑体膜が障害を受けるとクロロフィル蛍光の測定値が変

化すると考えられる。クロロフィル蛍光測定によって得られる指標の一つに PSII の最大量子収率 (F_v/F_m) があり、さまざまな植物種において組織の凍結障害との相関が報告されている (Ehlert and Hincha, 2008; Lindgren and Hällgren, 1993)。

ヒノキ科アスナロ属は日本の固有属で、アスナロ (*Thujopsis dolabrata* (L.f.) Siebold et Zucc. var. *dolabrata*) とヒノキアスナロ (*Thujopsis dolabrata* (L.f.) Siebold et Zucc. var. *hondae* Makino) の2変種が含まれる。分類学上、両変種はアスナロが南方変種、ヒノキアスナロが北方変種として位置付けられている。アスナロは山形県および宮城県以南の冬季に乾燥する太平洋側に広く分布する。ヒノキアスナロは能登半島、佐渡島および群馬県以北に分布し、日本海側の多雪地帯が分布の中心との記載もある (林, 1960; 倉田, 1964)。両変種は球果や葉の形態がわずかに異なるものの、形態のみで区別することは難しい。しかし、近年行われた系統地理的研究では両変種の間に顕著な遺伝構造が存在すると判明したことから (佐藤ら, 2015; Takahashi *et al.*, 2001, 2003), 両変種が日本列島の南北の異なる環境に対して適応する過程で、生理学的に異なる形質に分化してきた可能性があると言える。また、日本列島の太平洋側と日本海側では植物相が大きく異なることが知られているが、その大きな原因と考えられているのは冬季の環境である (酒井, 1976; 高橋, 1960)。以上のことから、生理学的な形質を測定することで、冬季の環境とアスナロ属変種間の分化との関係を検証できると考えた。そこで本研究では、その予備的な検証として、クロロフィル蛍光測定によって得られる PSII の最大量子収率 (F_v/F_m) がアスナロ属葉組織の耐凍性の指標として有効であるかを評価することを目的とした。

材料と方法

大畑ヒバ産地別見本林 (青森県むつ市) に植栽されたアスナロ属樹木の葉組織を採取し、クロロフィル蛍光測定に使用した。見本林は 1953 年に設定され、アスナロ属の天然分布域のほぼ全域から集められた 30 産地 399 本が植栽されている (高橋ら, 1998)。

このうち、本研究では現存する産地の中から 16 産地を選出し、各 1 個体を実験に供試した。ただし、徳島県に由来する個体は実験途中で枯死したため、解析には 15 個体を使用した (表 1)。サンプリングは 2016 年 9 月 28 日, 10 月 25 日, 11 月 17 日, 11 月 30 日, 12 月 21 日, 2017 年 2 月 15 日の計 6 回行った。

クロロフィル蛍光の測定には植物光合成総合解析システム LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, U.S.A.) のクロロフィル蛍光測定ユニット 6400-40 を使用し、 F_v/F_m を測定した。クロロフィル蛍光の測定サンプルは、毎回、異なる枝を高枝切りによって採取した。採取直後に測定対象の葉組織をアルミホイルに包み、20 分以上の暗処理を行ったのち、外気温下での F_v/F_m を 3 回測定した。続いてサンプルをプログラムフリーザーに入れ、1 時間あたり -2.0°C の速度で冷却した。 0°C で 1 時間保持したのち、さらに 1 時間あたり -2.0°C の速度で冷却した。0 から -30°C まで (9 月のみ -20°C まで) -2.0°C おきに葉の先端部分を 1 個体当たり 3 ヶ所切断してフリーザーから取り出し、アルミホイルに包んで氷上で緩やかに融解したのち、 F_v/F_m を測定した。

表1 大畑ヒバ産地別見本林に植栽されたアスナロ属のうち実験に使用した個体の産地

No.	産地	略称
1	北海道 檜山郡厚沢部村	HK
2	青森県 大畑地方	AM
3	秋田県 山瀬地方	AK
4	岩手県 岩手郡御所村	IW
5	宮城県 名取郡秋保村	MY
6	新潟県 佐渡郡高千村	NS
7	石川県 鳳至郡河原田村 (クサアテ)	IK
8	石川県 (マアテ)	IM
9	群馬県 利根郡水上町	GN
10	栃木県 高林村	TT
11	栃木県 塩谷郡箒根村	TH
12	長野県 木曾地方	NG
13	岐阜県 中津地方	GF
14	京都市 花背村	KY
15	鹿児島県 肝属郡吾平町	KG

外気温下で測定した F_v/F_m の季節変化を明らかにするため、9月28日の外気温下での測定値と他のサンプリング日の外気温下での測定値を、ダネットの検定(片側)によって多重比較した。また各測定日において、外気温下での F_v/F_m と各処理温度での F_v/F_m をダネットの検定(片側)によって多重比較し、最初に外気温下 F_v/F_m との有意差が見られた処理温度の直前の温度を、低温障害が出始める直前の閾値(転換温度; Jiang *et al.*, 1999)とみなした。解析には R ver. 3.6.1 を使用し (R Core Team, 2019), パッケージ nparcomp より関数 mctp.rm によって検定を行った (Konietschke *et al.*, 2015)。

結果と考察

外気温下で測定した F_v/F_m の季節変化を図1に示す。一般に健全でストレスを受けていない葉の F_v/F_m は 0.83 付近の値をとるとされている (Hunt, 2003)。2019年9月の F_v/F_m は全ての個体で 0.83 付近の値となっていることから、測定開始時点で各個体の葉は健全でストレスを受けていない状態だったと言える。一方、測定開始から2017年2月にかけて全ての個体で F_v/F_m は低下傾向を示した。9月時点での値と比べて F_v/F_m が有意に減少したタイミングは個体ごとに異なり、秋田 (AK), 岩手 (IW), 石川 (マアテ) (IM), 群馬 (GN), 長野 (NG), 鹿児島 (KG) では10月だが、北海道 (HK), 宮城 (MY), 新潟 (NS), 石川 (クサアテ) (IK), 栃木 (高林村) (TT), 岐阜 (GF), 京都 (KY) では11月, 青森 (AM) および栃木 (箒根村) (TH) では12月だった。一般に F_v/F_m は低温ストレスを受けると低下するが、これは植物が光阻害によってPSIIに障害を受けることが原因であると考えられている (Ogaya *et al.*, 2011; Oliveira and Peñuelas, 2000)。また、一部の多年生低木や針葉樹など冬季に成長を停止する樹種では、低温順化の一環として、冬季の低温下でキサントフィルサイクルを構成する色素が恒常的に脱エポキシ化し、過剰な光エネルギーを熱として放出する非光化学的消光が積極的に行われることが知られている (Adams and Demmig-Adams, 1994; Adams and

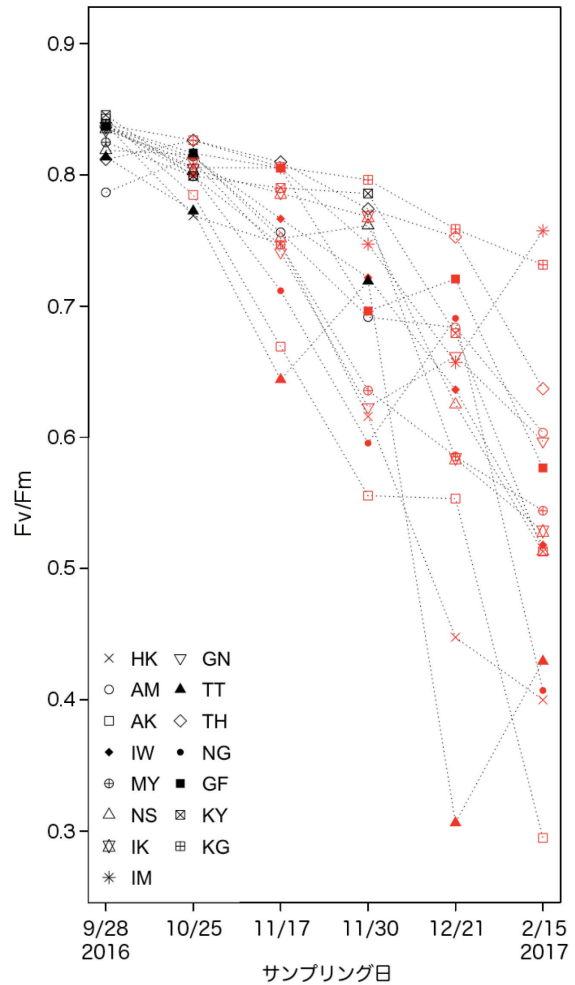


図1 外気温下で測定した F_v/F_m の季節変化
赤色の記号は、2016年9月28日サンプリング時と比較して有意に値が低下したことを示す。

Demmig-Adams, 1995; 向井, 2004; Yamazaki *et al.*, 2007). Goh *et al.* (2012) は非光化学的消光と PSII の効率の低下によって F_v/F_m も同様に低下することを指摘しており、アスナロ属の F_v/F_m の低下は光阻害による障害と葉組織の季節的な低温順化の両者を反映した結果と考えられる。以上のことから、アスナロ属においても F_v/F_m の測定値を用いることで冬季の低温環境下における光阻害および低温順化の程度を個体間で比較できることがわかった。

低温障害が出始める直前の転換温度は、 -30°C を下回ったタイミングが個体ごとに異なった (図2)。北海道 (HK), 秋田 (AK), 宮城 (MY), 石川 (クサアテ) (IK), 群馬 (GN), 栃木 (高林村) (TT), 栃木 (箒根村) (TH) は11月17日時点だった。青森

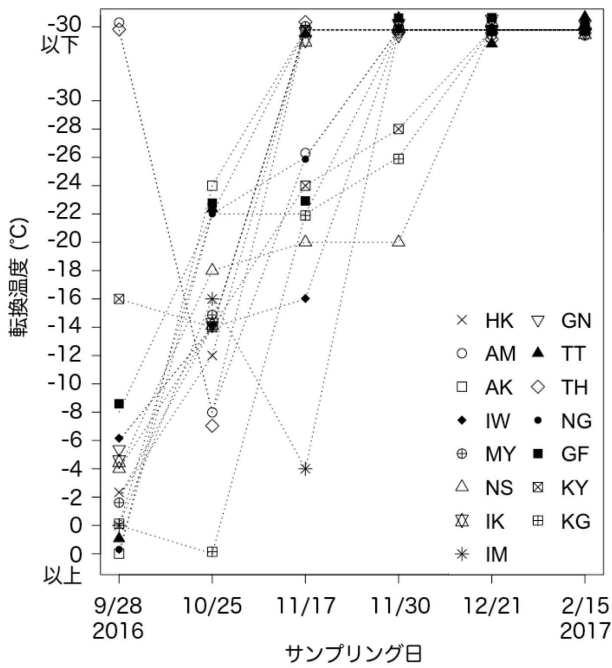


図 2 転換温度（低温障害が出始める直前の閾値）の季節変化

9月28日時点のAMおよびTHは、最も低い測定値である -20°C よりも転換温度が低かったため、 -30°C 以下に表示した。

(AM), 岩手 (IW), 石川 (マアテ) (IM), 長野 (NG), 岐阜 (GF) では 11月30日時点だった。最も -30°C を下回ったタイミングが遅かったのは新潟 (NS), 京都 (KY), 鹿児島 (KG) の 12月21日だった。Jiang *et al.* (1999) はブドウのシュートを使用し、凍結処理後のシュートの再成長テストによって測定された50%致死温度 (LT_{50}) と、師部および形成層で計測された F_v/F_m の転換温度を比較している。その結果、両者の示す季節的な変動パターンには相関が見られたことから、 F_v/F_m の転換温度は LT_{50} と同様の指標として使用できる可能性が示された (Jiang *et al.*, 1999)。本研究の結果においても、転換温度は秋から冬への季節変化に対応して低下し、変動パターンには明確な個体差が見られたことから、 F_v/F_m の測定値を用いた転換温度をアスナロ属組織の耐凍性の指標として使用可能であると考えられる。しかし、青森 (AM) と栃木 (箒根村) (TH) は9月28日時点で転換温度が -20°C を下回り、他個体と異なる結果となった。この原因としては、毎回のクロロフィル蛍光の測定サンプルが異なることから、耐凍性が比較

的高い組織を偶然測定してしまった可能性が考えられる。また特定の処理温度において、異なる3ヶ所で測定した F_v/F_m の標準偏差が0.3程度と非常に大きな値をとる個体も存在した。このような測定のはらつきを避けるためには、各産地由来の測定個体数を増やすとともに、各処理温度における F_v/F_m の個体あたり測定回数を増やす必要があるだろう。

本研究では、秋から冬にかけてアスナロ属の各個体が異なるタイミングで耐凍性を上昇させているパターンを F_v/F_m の測定によって明らかにすることができた。したがって、アスナロ属の耐凍性獲得過程の評価に F_v/F_m および転換温度を使用可能であると考えられる。今後の研究では、各集団の測定個体数を増やして比較を行うことで、アスナロ属が冬季の環境に対して変種間、集団間および系統間で異なる適応を示すか検証する予定である。

謝辞

秋田県立大学・木材高度加工研究所の工藤佳世特任助教 (現：同助教)、瀧誠志郎特任助教 (現：(国研) 森林機構森林総合研究所主任研究員)、秋山里美氏には現地での調査に協力いただいた。秋田県立大学の曾根千晴助教にはクロロフィル蛍光測定の原理について指導を受けた。秋田県立大学の星崎和彦准教授 (現：同教授) には、LI-6400XT の使用について便宜をはかっていただいた。記して厚く御礼申し上げる。本研究は秋田県立大学平成27年度学長プロジェクト研究費若手・スタートアップ奨励研究、および JSPS 科研費 JP16K18723 の支援を受けて行われた。英文校閲は Enago (www.enago.jp) によって行われた。

文献

Adams, W. W., Demmig-Adams, B. (1994). Carotenoid composition and down regulation of photosystem II in three conifer species during the winter. *Physiologia Plantarum*, 92, 451–458.

Adams, W. W., Demmig-Adams, B. (1995). The xanthophyll cycle and sustained thermal energy

- dissipation activity in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter. *Plant, Cell & Environment*, 18, 117–127.
- Ehlert, B., Hinch, D. K. (2008). Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in *Arabidopsis* leaves. *Plant Methods*, 4, 1–7.
- 藤川清三 (1996). 「植物の凍結温度への適応機構」『低温生物工学会誌』42, 26–30.
- Goh, CH., Ko, SM., Koh, S., Kim, YJ., Bae, HJ. (2012). Photosynthesis and Environments: Photoinhibition and Repair Mechanisms in Plants. *Journal of Plant Biology*, 55, 93–101.
- 林弥栄 (1960). 『日本産針葉樹の分類と分布』. 農林出版.
- Hunt, S. (2003). Measurement of photosynthesis and respiration in plants. *Physiologia Plantarum*, 117, 314–325.
- Jiang, H., Howell, G. S., Flore, J. A. (1999). Efficacy of chlorophyll fluorescence as a viability test for freeze-stressed woody grape tissues. *Canadian Journal of Plant Science*, 79, 401–409.
- Konietschke, F., Placzek, M., Schaarschmidt, F., Hothorn, L. A. (2015). nparcomp : An R software package for nonparametric multiple comparisons and simultaneous confidence intervals. *Journal of Statistical Software*, 64, 1–17.
- 倉田悟 (1964). 『原色日本林業樹木図鑑 第1巻』. 地球出版.
- Lindgren, K., Hällgren, JE. (1993). Cold acclimation of *Pinus contorta* and *Pinus sylvestris* assessed by chlorophyll fluorescence. *Tree Physiology*, 13, 97–106.
- Mishra, A., Mishra, K. B., Höermiller, I. I., Heyer, A. G., Nedbal, L. (2011). Chlorophyll fluorescence emission as a reporter on cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 301–310.
- 向井讓 (2004). 「低温条件下で樹木が受ける光ストレスとその防御機能」『日本林学会誌』86, 48–53.
- Ogaya, R., Peñuelas, J., Asensio, D., Llusià, J. (2011). Chlorophyll fluorescence responses to temperature and water availability in two co-dominant Mediterranean shrub and tree species in a long-term field experiment simulating climate change. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 89–93.
- Oliveira, G., Peñuelas, J. (2000). Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. *Acta Oecologica*, 21, 97–107.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- 酒井昭 (1976). 「植物の積雪に対する適応」『低温科学』34, 47–76.
- 酒井昭 (1995). 『植物の分布と環境適応 熱帯から極地・砂漠へ』. 朝倉書店.
- 佐藤都子, 長谷川陽一, 三嶋賢太郎, 高田克彦 (2015). 「アスナロ属 (ヒバ、アスナロ) 天然林を対象とした EST-SSR マーカーによる遺伝構造解析」『第126回日本森林学会大会・大会学術講演集』128.
- 園池公毅 (2008). 「クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定」『低温科学』67, 507–524.
- 高橋啓二 (1960). 「植物分布と積雪」『森林立地』2, 19–24.
- Takahashi, K., Nagahama, S., Nakashima, T., Suenaga, H. (2001). Chemotaxonomy on the leaf constituents of *Thujaopsis dolabrata* Sieb. et Zucc.—Analysis of neutral extracts (diterpene hydrocarbon). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 839–848.
- Takahashi, K., Nagahama, S., Nakashima, T., Suenaga, H. (2003). Chemotaxonomy on the leaf constituents of *Thujaopsis dolabrata* Sieb. et Zucc.—analysis of acidic extracts. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 723–738.
- 高橋誠, 糸屋吉彦, 向田稔, 西村慶二 (1998). 「ヒバ (*Thujaopsis dolabrata*) 見本林におけるヒノキ

漏脂病被害の林内分布と産地間差』『日本森林学会誌』 80, 176-183.

上村松生, 南杏鶴, 河村幸男 (2009). 「凍結ストレスと植物」『低温生物工学会誌』 55, 29-36.

上村松生 (2014). 「植物の低温馴化および凍結耐性メカニズムに関する基礎研究」『低温生物工学会誌』 60, 1-8.

Yamazaki, JY., Tsuchiya, S., Nagano, S., Maruta, E. (2007). Photoprotective mechanisms against winter stresses in the needles of *Abies mariesii* grown at the tree line on Mt. Norikura in Central Japan. *Photosynthetica*, 45, 547-554.

〔 令和 2 年 6 月 30 日 受付
令和 2 年 7 月 16 日 受理 〕

Measuring the Process of Acquiring the Freezing Tolerance of Genus *Thujopsis* Using Chlorophyll Fluorescence Measurement

Michiko Inanaga¹, Katsuhiko Takata²

¹ Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Forest Research and Management Organization

² Institute of Wood Technology, Akita Prefectural University

Genus *Thujopsis* (Cupressaceae) is endemic to Japan and includes two varieties, *Thujopsis dolabrata* (L.f.) Siebold et Zucc. var. *dolabrata* and *Thujopsis dolabrata* (L.f.) Siebold et Zucc. var. *hondae* Makino. Taxonomically, the former is regarded as the southern variety and the latter as the northern variety. Both varieties have adapted to different winter environments and have developed physiologically distinct traits. Therefore, it may be possible to verify the differentiation between the two varieties by measuring their freezing tolerance, which is one of their physiological traits. The aim of this study was to assess the effectiveness of chlorophyll fluorescence measurement for estimating the process of acquiring freezing tolerance in Genus *Thujopsis*. We collected leaf tissues from the genus *Thujopsis* from 15 provenances from September 2016 to February 2017, and F_v/F_m , an index of chlorophyll fluorescence, was obtained after performing low-temperature treatment from 0 to -30°C . Our results showed that the threshold (turning-point temperature) just before the onset of cold injury decreased in accordance with the seasonal change from autumn to winter, and there was a clear individual difference in the decrease pattern of the turning-point temperature. Thus, we conclude that F_v/F_m and the turning-point temperature can be used as a freezing tolerance indicator of the leaf tissues of Genus *Thujopsis*.

Keywords: *Thujopsis*, freezing tolerance, chlorophyll fluorescence, F_v/F_m