

形態形質と内部構造からみたトドマツ苗木の当年生葉の発達と遮光処理に対する応答

石塚 航*・菅井徹人**

Needle development and shade response of Sakhalin fir seedlings, based on morphological traits and anatomical structure of leaves

Wataru ISHIZUKA* and Tetsuto SUGAI**

要旨

急激な光条件変化に対するトドマツの馴化応答を把握するため、苗畑にて展葉が済んだタイミングで遮光処理を行い、トドマツ苗木における当年葉の形態形質と内部構造の変化を、成長期間を通して観察した。比較のために用意したアカエゾマツ、エゾマツ苗木とともに、展葉開始後から定期的に当年葉をサンプリングし、形態形質として葉面積あたりの葉重(LMA)を測定した。また、6～10月にかけて4時点のトドマツサンプルについて解剖切片を作成して葉の内部構造を画像解析した。どの樹種も6～7月上旬にLMAが増加したものの、遮光下のトドマツは光条件下のものよりも有意に値が低く、LMAの増加が抑えられていた。この傾向はアカエゾマツでも観察された。遮光下のトドマツ苗木における葉厚や葉肉細胞厚に対する柵状組織厚の割合はどの時点でも一定だった。一方、通常の光条件下におけるそれらは徐々に増加し、10月時に有意差が検出された。以上の観察より、LMAは遮光に対して速やかな応答がみられること、柵状組織厚の割合といった内部構造の変化は数ヶ月遅れて生じたことがわかった。LMAに認められた速やかな馴化応答は、内部構造ではなく葉厚による応答が担う可能性が示唆された。

キーワード：光環境変化, 馴化応答, LMA, 柵状組織, 針葉樹

はじめに

モミ属の1種、トドマツ (*Abies sachalinensis*) は北海道全域に自生し、北海道の森林における蓄積が最も多い樹種である(北海道水産林務部 2020)。現在は年間おおよそ500万本の苗木需要があるが、既存のトドマツ人工林が伐期を迎えつつあることから、今後も造林用苗木の需要増加が見込まれており、さらなる優良種苗の安定供給が求められている(北海道 2017; 北海道水産林務部 2020)。また、トドマツはトウヒ属のアカエゾマツ (*Picea glehnii*) やエゾマツ (*P. jezoensis*) とともに北海道の極相林を構成する主要種でもあり、これら3種は北海道を代表する常緑針葉樹である。これらの樹種は、その光応答特性として高い耐陰性を有することが古くより知ら

れており(高橋 1969)、この特性によって樹冠下のような光条件の優れない環境でも生育が可能である(藤村・坂上 1977; 坂上・藤村 1981)。高い耐陰性を実現するには暗い光条件下での効率的な光吸収・利用が求められるが、これは形態や個葉の内部構造、色素含有量などによる応答が担っている(彦坂 2016; 小池 2005)。

それと同時に、光条件の“急激な変化”に対する応答、すなわち馴化応答についても、トドマツや北米の林業用樹木で同じモミ属の一種 *A. amabilis* を用いて調べられている(Brooks et al. 1994; 1996; Kitao et al. 2018; 2019)。トドマツの研究からは、急激に明るくなる場合には、樹冠下で生育するトドマツの馴化応答が間に合わずストレスになること(Kitao et al. 2018)、なかでも冬期の林冠木伐採は、稚樹の翌年の成長に負

* 北海道立総合研究機構林業試験場 Forestry Research Institute, Hokkaido Research Organization, Bibai, Hokkaido, 079-0198

** 北海道大学大学院農学研究院植物栄養学研究室

Plant nutrition laboratory, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 060-8589

[北海道林業試験場研究報告 第58号 令和3年3月, Bulletin of the Hokkaido Forestry Research Institute, No. 58, March, 2021]

の影響を及ぼすことが示された (Kitao et al. 2019)。一方、急激に明るくなる変化に速やかに応答できる樹種も知られる。そのような樹種は、攪乱や倒木によるギャップ形成に依存した生活史戦略をとっており (Oguchi et al. 2018)、速やかな応答は、成熟後の陰葉が光条件変化に対して高い馴化応答を示すことに起因する (Oguchi et al. 2003)。

また、光条件の急激な変化として、上記とは逆に、急に暗くなる状況も考えられる。たとえば自己被陰や、人工造林後の下層植生による被陰、天然更新下での近隣の植生・競合他種による被陰である (Brooks et al. 1994; 1996)。*A. amabilis* を用いた研究からは、被陰に対して個葉レベルで速やかな応答ができることが報告される (Brooks et al. 1996)。トドマツや耐陰性の高い他樹種も、急激に暗くなる光条件変化に対して高い馴化応答を示す可能性があり、たとえば、被陰に対する成長面での応答に関する知見 (福地ら 1982; 水井ら 1979)、被陰に対する個葉形質の応答に関する知見 (野口ら 2003; 高橋 1969) が蓄積されている。しかしながら、先行研究からは、個葉レベルで変化に追従するような速やかな馴化応答がみられるのかはわからない。その理解のためには、実際に周囲植生の出現や展葉に伴う被陰を模した遮光実験によって検証することが有効である。その際、主たる応答が期待できるのは成熟過程にある当年葉であることから (Kitao et al. 2018; Oguchi et al. 2003)、当年葉の展開とその後の発達の過程を経時的な追跡によって明らかにしつつ、その中で急激に暗くなる光条件変化がどのような個葉形質に、どのような時間スケールで影響を及ぼすか知る必要がある。

個葉形質として代表的な機能パラメータに挙げられるのは「葉面積あたり葉重」(以降、LMA; Leaf Mass per Area) である (彦坂 2016)。この形質は個葉の発達に伴って変化し、明るい環境で展開した葉ほど高く、暗い環境下ほど低くなることが知られるため、光条件変化に対しての馴化応答を担うと考えられる主要な候補形質である。ただし、LMAにおける応答がみられたとしても、このパラメータのみからでは、厚みといった葉組織そのものの形態形質を変化させたのか、葉組織内における内部構造、たとえば葉肉細胞内において細胞間隙がない柵状組織と細胞間隙が多い海綿状組織の比率を変化させたのかなど、具体的な応答メカニズムに迫ることはできないため、葉重と密接に関わる葉内部構造の把握も必須である。これら個葉の形態形質、内部構造の応答把握を通して、速やかな馴化応答についての基礎的知見を得ることは、今後の造林用苗木の管理、造林後の保育、もしくは天然更新施業のそれぞれを考える上で有益な知見となる。

そこで本研究では、トドマツ苗木における当年葉の形態形質と内部構造について、成長期間を通して観察し、遮光処理によって急激に暗くさせた際の応答を調べた。ここから、トドマツ当年葉は、光条件変化に対して形態形質の変化、もしくは内部構造の変化によって速やかに応答できるのかを明ら

かにした。また、調査個体数に限りはあるが、遮光実験に供したアカエゾマツ、エゾマツの苗木についても当年葉の形態形質の1成長期間を通じた変化や遮光応答を測定し、比較したので報告する。

材料と方法

1. 試験デザイン

試験は北海道美瑛市にある北海道立総合研究機構林業試験場(以降、林業試)の苗畑において、2019年に実施した。トドマツについては、同じ苗畑で野外の通常光条件下で生育させていた4年生苗(2019年の成長期には5年生となる)から選定した。系統別で試験することとし、新冠採種園の2014年産種子に由来する母樹別苗木群のうち、トドマツ精英樹の美深1号、函館4号、池田5号、厚岸115号の4系統をそれぞれ母樹とする苗木を2本ずつ選んだ。2019年4月18日に床替えのために掘り取った際、対象個体を雪室(暗室)に仮置きした。アカエゾマツ、エゾマツについては、同様に苗畑で生育させた8~10年生苗から対象を選定し、本遮光処理試験の比較として用いた。これら2樹種は東京大学北海道演習林が収集した種子に由来し、林業試の苗畑へ複数年にかけて播きつけたもので、複数回の床替えを経る中で健康な苗木のみを混合して育苗していたため、正確な苗齢は不明だった。各樹種で健康な苗木を2本ずつ選び、5月13日に雪室(暗室)に仮置きした。

5月17日に、耕うんした畝に約0.5 m × 3 mの区画を2つ設定し、それぞれの区画へトドマツ4本、アカエゾマツ1本、エゾマツ1本ずつを植えた。エゾマツについては、植えつけの時点で冬芽の芽鱗がほころび始めて開葉段階へと入っていた。苗木は通常の苗畑での育苗方法にのっとって生育させた。灌水は行わず、植えつけ後に一度のみ、個体あたり約8 gのオスモコートエグザクト(N16-P9-K12)スタンダードを元肥として与えた。

設定した2区画のうち1つを「遮光群」、もう1つを「通常条件群」として設定した。当年葉の展葉が済んだタイミングを見計らって、遮光群については2重にした遮光ネット(10%透過率の寒冷紗)で覆い、遮光処理を施した(図-1)。遮光開始日は6月20日であった。通常条件群は、対照処理にあたり、通常の苗畑における光条件下で生育させるため遮光等の光条件の変化を伴う処理をしなかった。試験は降雪直前の11月上旬まで継続した。7月から10月にかけて30分ごとに気温と照度をデジタルロガー(HOBO Pendant Temperature/Light, Onset Computer Corporation, アメリカ)を用いて測定した。月の初日から末日までのデータが揃う8~9月について集計すると、通常条件群の日平均気温が21.2°C、日中(7時~17時)平均照度が35,119 Luxで、遮光群のそれらは19.5°C、324 Luxであった。すなわち、本試験の遮光群の個体は99%遮光されたことになる。

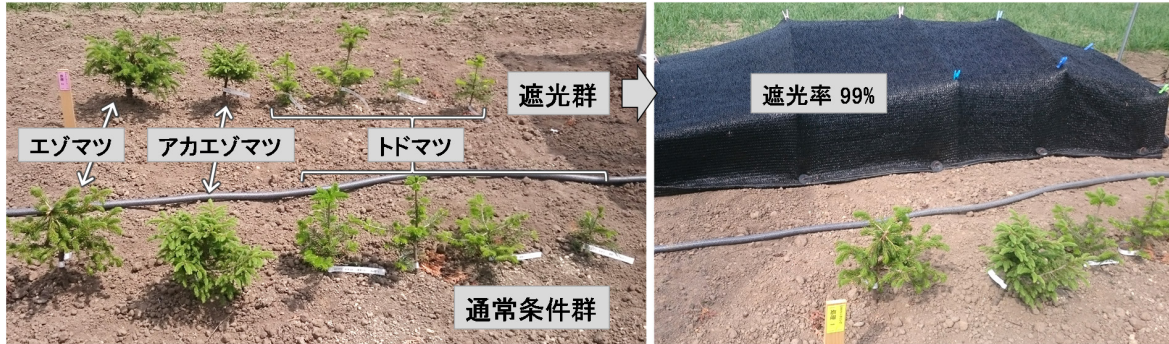


図-1 通常条件群と遮光群の様子
 写真はともに2019年6月20日に撮影し、左写真は遮光処理を実施する直前の苗木の様子。

2. 葉形態の測定

当年葉の葉形態について、成長期を通じた推移と遮光処理の影響を把握するため、定期的な観察、ならびに葉面積と葉重の測定を実施した。測定日は2019年5月22日、5月30日、6月7日、6月14日、6月20日（遮光処理の直後に実施）、7月7日、7月18日、8月1日、8月21日、9月3日、9月17日、10月2日、11月6日のべ13回だった。各測定にあたっては、全個体について側枝を対象として当年シュート（枝）を1枝剪定した。安定して平均的な葉形態形質値が得られるように、頂端部を除いた枝側面、また、なるべく枝中央付近より当年葉を摘葉して供試材料とした(図-2)。5月中のサンプリングのみ未展葉個体があったため、これらは欠損として扱った。

なお、同一個体での経時的なモニタリングを行っているものの、毎回のサンプリングにおいて1枝を選んで剪定する手法のため、個体内におけるシュート状態の違いを含んだ測定であることに留意されたい。

葉形態の測定では、サンプリングと同一日のうちに当年葉の葉面積 (LA; Leaf Area) を測定した。図-2にあるように、シュートより十分量の葉を摘葉し、針葉同士が重ならないように並べたのちにスキャナを用いてデジタル画像を取得した。展葉段階にある葉、すなわち6月14日までのサンプリングに関しては、柔らかく微細な展葉したての針葉を扱うのに適した小型デジタルスキャナ (MSC10, KING JIM, 日本) を用い、380dpi設定でデジタル画像化した (取得した針葉数は最

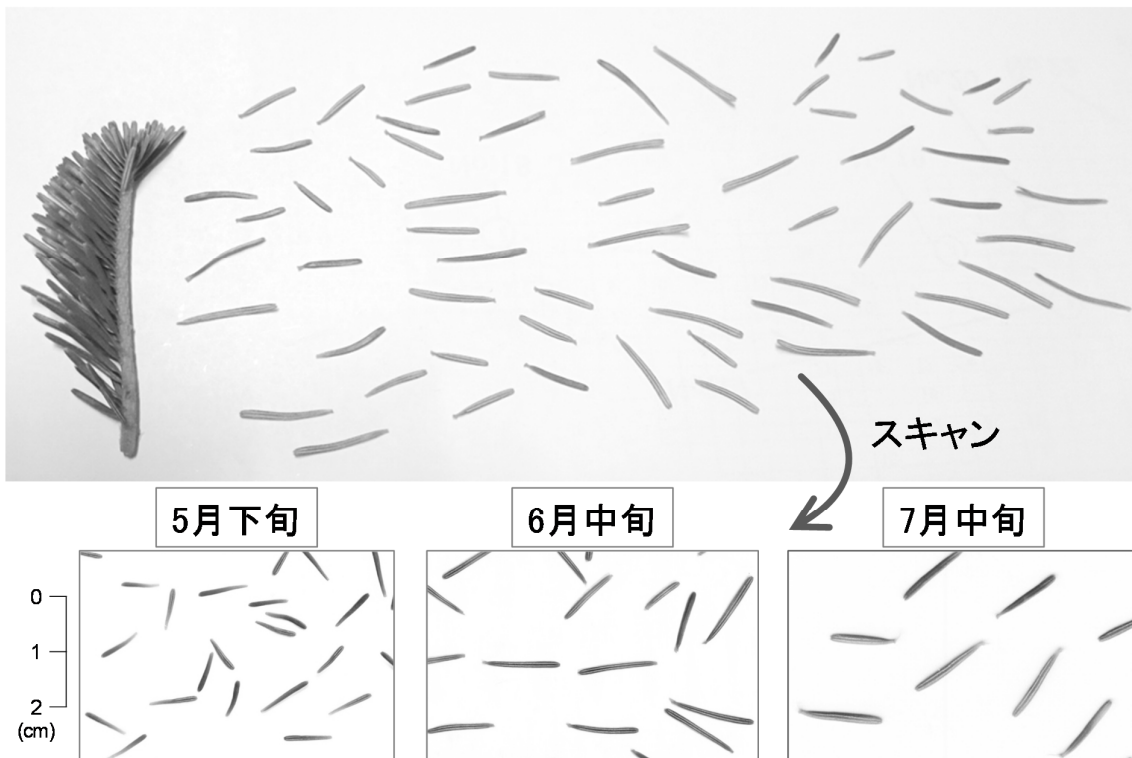


図-2 当年シュートのサンプリングとスキャンした針葉の様子
 トドマツの例で、上段の写真は2019年6月7日のサンプリング時に撮影。通常条件群の1個体について時期別にスキャンした葉画像の一部を下段に並べて示す。画像スケールは共通し、左に示すとおり。

小23枚～最大100枚、平均50枚)。6月20日以降のサンプリングに関しては、針葉が大きく厚く発達してきたことから小型デジタルスキャナで扱いにくくなり、卓上型デジタルスキャナ(CanoScan LiDE 90, CANON, 日本)を用いることとし、300dpi設定でデジタル画像化した(取得した針葉数は最小20枚～最大93枚、平均42枚)。なお、9月17日のサンプリングに関しては、調査の都合上、小型デジタルスキャナを用いて、卓上型デジタルスキャナの場合と同等の針葉数を画像化することとした(最小21枚～最大57枚、平均41枚)。得られたデジタル画像は、葉の重なりがないことを確認したのち、葉面積測定ソフトLIA32(<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shinkan/LIA32/>)を用いてサンプリング回毎・個体毎の葉数と総葉面積(mm²)を算出した。これらより、平均個葉面積(mm²)を求めLAの値とした。

画像化して葉面積を測定した葉は、その後通風乾燥機(乾燥器GT-80, アルプ, 日本)により80℃下に最低3日間据置して乾燥させたのちに微量型電子天秤(CPA224S, sartorius, ドイツ)を用いて乾燥重量(0.1mg単位で測定)を測定した。総葉面積と乾燥重量から葉面積あたり葉重(LMA: Leaf Mass per Area, g m⁻²)を算出した。本指標は、値が大きいほど葉断面における細胞数が多いことを表し、一般的に、葉の展開とその後の葉の発達に沿って徐々に値が大きくなる。LMAが高くなった際の解釈は1つではなく、厚みのある葉が形成された場合、もしくは、厚さは変わらず細胞が充填して中身の詰まった葉が発達した場合が想定される。そこで、成長期を通じたLMAのモニタリングに加えて、以下のように葉内部構造についても観察し、LMA応答に関連する要因を探った。

3. 葉内部構造の画像解析

トドマツのみを対象として、同一個体から葉をサンプリングするため、あらかじめ遮光群と通常条件群の2区画それぞれで3個体を観察対象として選んだ。サンプリングしたシュートのうち、形態測定後に残っている葉の中から、枝中央付

近の状態の良い葉を約4枚抽出し、当年葉の内部構造を観察・解析した。本調査は時系列に沿って、6月20日(植栽35日後)、7月18日(植栽63日後)、8月21日(植栽97日後)、10月2日(植栽139日後)の合計4回実施することとした。初回(6月20日)は展葉が済んだタイミングであり、遮光処理を開始した直後である。葉はサンプリング直後に30%のエタノールが入ったチューブに入れ、解剖切片を作成するまで-80℃で冷凍保存した。観察にあたっては、まず、葉の試料から滑走式凍結マイクローム(ESM-350, ERMA, 日本)を用いて10μm厚の切片を切削し、無染色のまま光学顕微鏡(WR851-1, MAXLAPTEK, 中国)で観察し、デジタルデバイス(iPhone 8, Apple, アメリカ)で撮影した。解剖切片は針葉の葉身の中央付近で作成することとし、観察に適した切片が得られるまで切削を繰り返した。

作成した切片画像から画像解析ソフト(ImageJ, NIH, アメリカ)を用いて葉断面における内部構造の測定を行った。測定対象としたのは、図-3に示す葉断面の中央部分、維管束をまたぐように葉の表面・裏面と直行する方向(図-3点線)の構造である。測定部分において、葉表面の表皮組織厚(TE: thickness of epidermis tissue layer)、葉表面の表皮組織末端から維管束までの柵状組織厚(TP; thickness of palisade tissue layer)、葉の表裏の表皮組織を除いた葉肉細胞厚(TM; thickness of mesophyll cell layer)、全体の針葉厚(TN; thickness of needle leaf layer)の4つの構造を特定し、それぞれの両端を結んだピクセル距離を求めた。これらをもとに、全体の葉厚に対する占有割合や、葉肉細胞厚に対する柵状組織厚の占有割合について、以下のとおりに定義して算出した:

$$\text{Mesophyll cell (\%)} = \text{TM} \div \text{TN} \times 100,$$

$$\text{Palisade tissue (\%)} = \text{TP} \div \text{TN} \times 100,$$

$$\text{Epidermis tissue (\%)} = \text{TE} \div \text{TN} \times 100,$$

$$\text{Palisade/Mesophyll (\%)} = \text{TP} \div \text{TM} \times 100.$$

なお、技術的課題ゆえに、ピクセル距離は実際の長さへ変換できなかった。

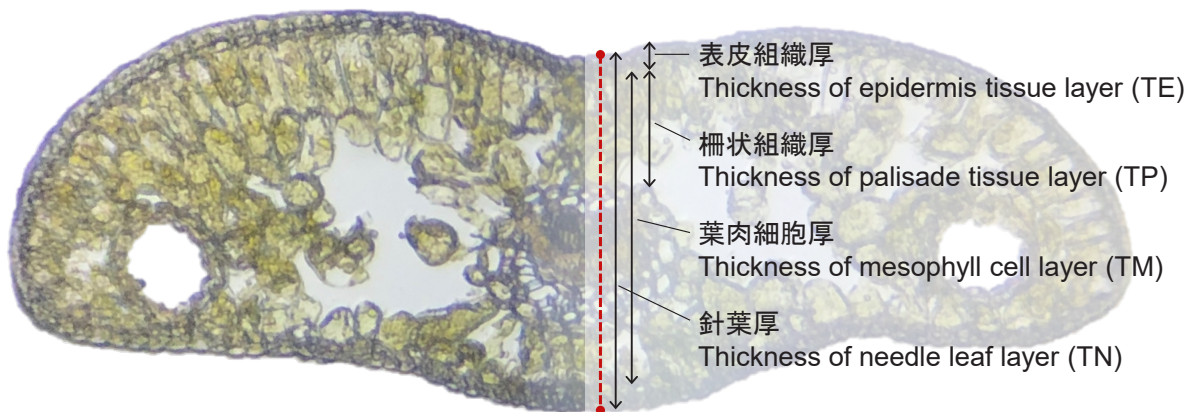


図-3 トドマツ当年葉の切片画像と測定対象とした各構造

葉断面の中央部分(点線箇所)において全構造を計測し、2点間距離(ピクセル数)を厚さの相対値として扱った。

4. 処理差の解析

各処理で個体反復があるトドマツのみを対象とし、統計解析によって遮光処理の効果の有無を解析した。解析はR 4.0.0 (R core team 2019) を用い、処理の違い (遮光群と通常条件群) を固定効果とした一元配置分散分析 (ANOVA) による。また、解析対象とした形質は、葉形態についてはLMAとLA、葉内部構造については全体の葉厚に対する占有割合 (Mesophyll cell, Palisade tissue, Epidermis tissue) と葉肉細胞厚に対する柵状組織厚の割合 (Palisade/Mesophyll) とした。本研究では同一個体の経時的なサンプリングを実施しているが、全形質がデータセットとして揃う、6月20日 (植栽35日後)、7月18日 (植栽63日後)、8月21日 (植栽97日後)、10月2日 (植栽139日後) の4時点における形質値を解析対象にした。なお、それぞれの測定はシュートをサンプリングする破壊的調査であり、同一個体であっても測定枝が異なり、時系列に沿って疑似反復のデータとなっていると判断されたことから、4時点のデータを包括せず、それぞれの時点において独立して分散分析を実施することとした。

結果

1. 形態形質の発達と処理差

3樹種における成長期を通じた当年葉のLMAの時系列変

化を図-4に示す。エゾマツについては遮光群の個体において9月3日時点で枯死が観察されたため、以降の測定はできなかった (図-4C)。その他の個体については、遮光群と通常条件群とによらず、成長期間を通してすべて健全だった。

通常条件群におけるトドマツ当年葉のLMAは、展葉直後には 35 g m^{-2} 前後で横ばいだったが、展葉が済んで以降に大きな変化が認められ、7月7日時点では $89.9 \pm 8.0 \text{ g m}^{-2}$ にまで増加していた。その後も成長期を通して微増し続ける発達パターンを認めることができ (図-4A)、11月6日時点における値は $127.7 \pm 10.7 \text{ g m}^{-2}$ だった。一方、遮光群におけるトドマツ当年葉のLMAは、遮光処理を開始して以降の変化が明瞭ではなく、7月7日と11月6日時点の値はそれぞれ $56.4 \pm 4.4 \text{ g m}^{-2}$ 、 $66.8 \pm 5.6 \text{ g m}^{-2}$ だった。通常条件群と比較すると、それぞれ0.6倍、0.5倍だった。

分散分析の結果、LMAについて4時点ですべて有意な処理効果 ($p < 0.05$) が認められた (表-1)。遮光処理開始直後である6月20日時点のLMAは通常条件群、遮光群がそれぞれ $43.2 \pm 1.3 \text{ g m}^{-2}$ 、 $61.5 \pm 1.7 \text{ g m}^{-2}$ で遮光群のほうが高い値だった。しかし、それ以降では群間の順位が逆転し、3時点のすべてで通常条件群 (平均 $95.0 \sim 116.2 \text{ g m}^{-2}$) のほうが遮光群 (平均 $56.1 \sim 66.0 \text{ g m}^{-2}$) よりも高いLMAを示した。

アカエゾマツの当年葉におけるLMAでは、トドマツと類似

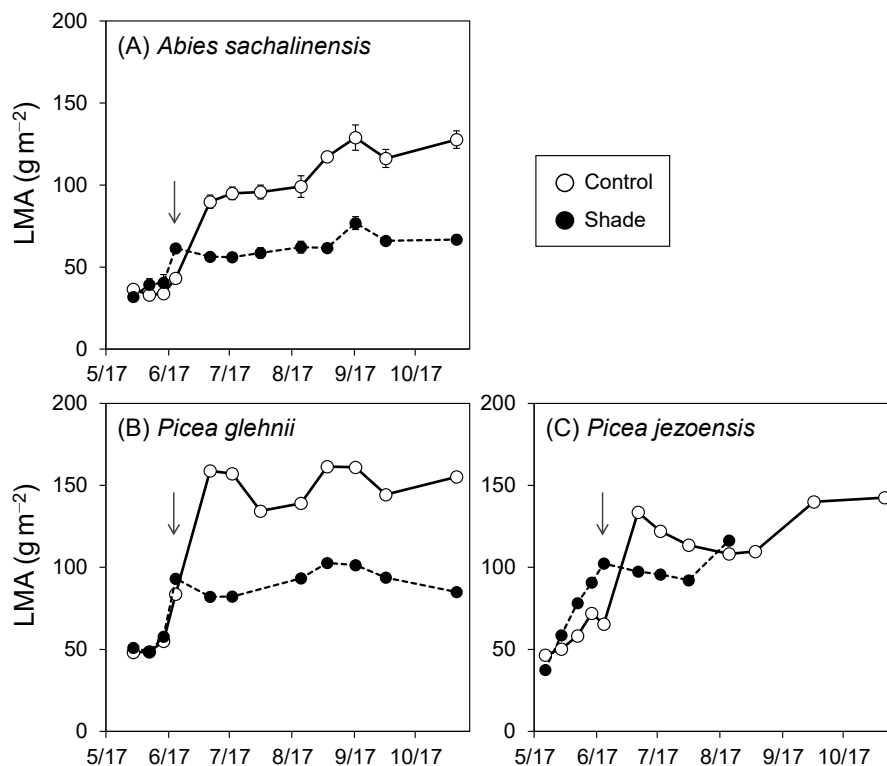


図-4 異なる光条件におけるLMAの季節推移

開葉後から成長期間を通じた、トドマツ (A: *A. sachalinensis*)、アカエゾマツ (B: *P. glehnii*)、エゾマツ (C: *P. jezoensis*) における葉面積あたり葉重 (LMA) の推移を示す。白丸・実線は通常条件群、黒丸・破線は遮光群の値で、反復測定のあるトドマツについてはエラーバーで標準誤差を示す。横軸は日付で、起点を植栽日とした。遮光を開始した日を矢印にて示す。

表-1 トドマツの当年葉形態に関するANOVA

Date	LMA (g m^{-2})				LA (mm^2)			
	df	MS	F-value	p-value	df	MS	F-value	p-value
6/20	1	670	222.4	< 0.0001	1	0.095	0.007	0.935
7/18	1	3030	63.41	< 0.0001	1	0.006	0.000	0.989
8/21	1	2731	18.08	0.005	1	0.000	0.000	0.998
10/2	1	5045	56.60	0.0003	1	0.822	0.070	0.801

日付は2019年。LMAは葉面積あたり葉重を、LAは個葉の葉面積を解析に用いた結果であることを示し、dfは自由度(degree of freedom)を、MSは平方平均(Mean Square value)を示す。

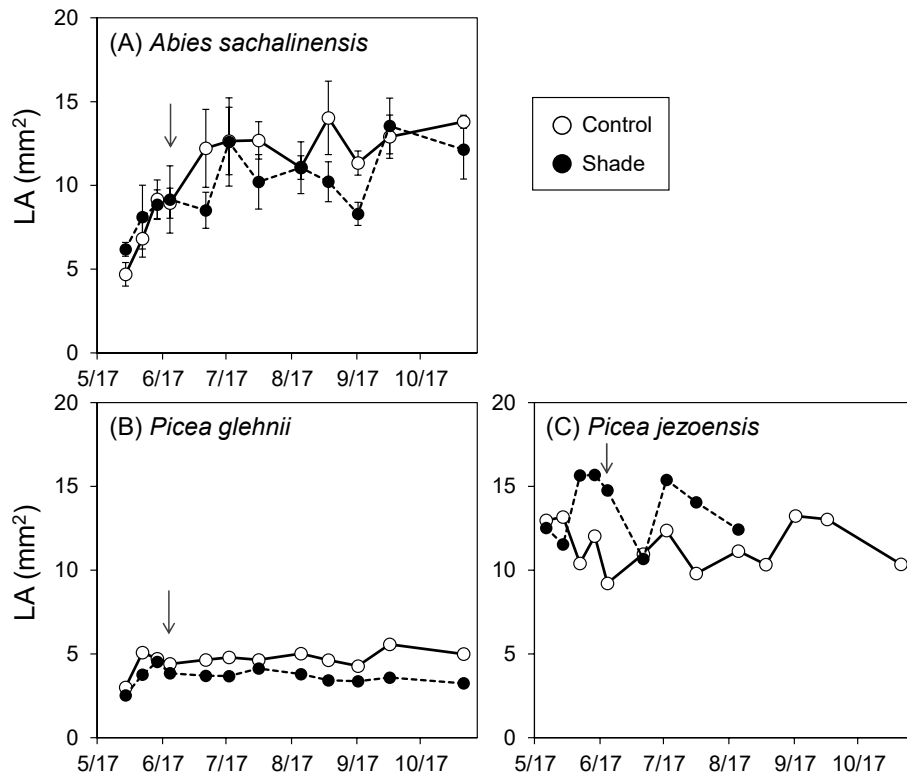


図-5 異なる光条件における個葉面積の季節推移

開葉後から成長期間を通した、トドマツ (A)、アカエゾマツ (B)、エゾマツ (C) における個葉の葉面積の推移を示す。白丸・実線は通常条件群、黒丸・破線は遮光群の値で、反復測定のあるトドマツについてはエラーバーで標準誤差を示す。横軸は日付で、起点を植栽日とした。遮光を開始した日を矢印にて示す。

した経時変化を示した(図-4B)。上述したトドマツと推移パターンの共通性が認められ、展葉の完了後、6月中旬～7月上旬にかけて顕著なLMAの増加が認められること、遮光された個体についてはLMA増加が頭打ちとなることがわかった。一方、7月7日以降のアカエゾマツのLMAは、通常条件群が134.3～161.5 g m^{-2} 、遮光群が82.1～102.7 g m^{-2} で、トドマツの通常条件群でみられたような7～11月期におけるLMAの微増は不明瞭だった。エゾマツについては、本種の展葉が早かったこともあり、通常条件群の個体で6月初旬～7月上旬にかけてLMAの増加が認められた(図-4C)。7月7日以降のエゾマツのLMAは、通常条件群が108.3～142.5 g m^{-2} 、遮光群が92.2～116.4 g m^{-2} で、遮光した個体のLMAが若干低い傾向があるものの処理条件間で類似した。ただし、上述のとおり、遮光群の個体は成長期間途中で枯死した。なお、ア

カエゾマツ遮光個体の8月1日サンプルと、エゾマツ9月17日サンプルについては、葉の乾燥重量が大きかったために、算出されたLMAはそれぞれ146.8 g m^{-2} と239.2 g m^{-2} と外れ値となった。これらのサンプルについては、サンプリングシュートの状態に依存した異常値とみなし、欠損扱いとした。

成長期を通した当年葉のLAの時系列変化を図-5に示す。トドマツについては、7月7日時点でほとんどLAの増加は頭打ちとなる推移パターンであった(図-5A)。通常条件群のLAは、7月7日時点で $12.2 \pm 4.7 \text{ mm}^2$ だったのに対して、6月14日時点ではその75%にあたる $9.2 \pm 2.3 \text{ mm}^2$ となっており、植えつけから約30日で葉面積の約75%が形成を済ませていたことを示した。LAについて分散分析を行った結果、4時点のいずれにおいても、処理の効果は有意ではなかった(表-1)。すなわち、遮光処理をしたことでLAに変化が認めら

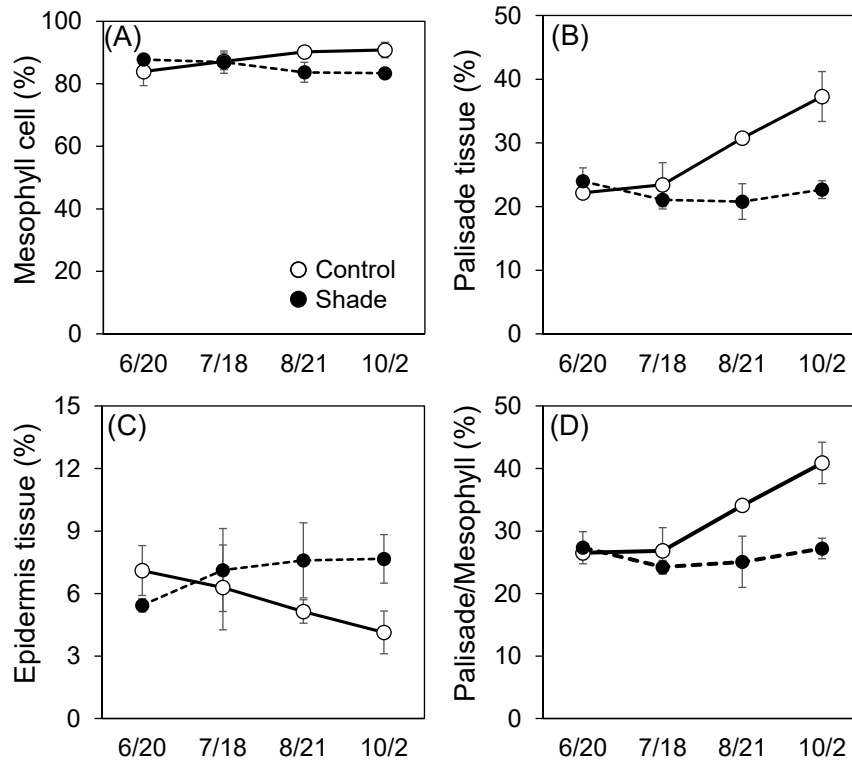


図-6 異なる光条件における当年葉内部構造の季節推移

トドマツ当年葉を対象として、針葉厚に対する葉肉細胞厚 (A)、柵状組織厚 (B)、表皮組織厚 (C) それぞれの割合と、葉肉細胞厚に対する柵状組織厚の割合 (D) を示す。白丸・実線は通常条件群、黒丸・破線は遮光群の値で、エラーバーは標準誤差。横軸は日付で測定日の順に並べた。6/20が遮光開始直後の値。

れたわけではなかった。

本試験では、個葉サイズの小さいアカエゾマツ、ならびに開葉が早かったエゾマツのLAについては、時系列推移が不明瞭であった (図-5 B, C)。アカエゾマツについては、遮光処理後一貫して、通常の光条件下よりも遮光下でLAが小さい傾向が観察された。

2. 内部構造の発達と処理差

トドマツ当年葉において、通常条件群のMesophyll cell (葉肉細胞厚の割合) は、時系列に沿った増加傾向があり、最終的には平均90%に至っていた (図-6 A)。一方、遮光群のそれは減少傾向を示し、最終的には平均83%に低下していた。分散分析の結果、4時点のうち最後 (10月2日) のサンプルにおいて有意な処理間の違いが検出された (表-2, $p < 0.05$)。

通常条件群のPalisade tissue (柵状組織厚の割合) も時系列に沿った増加傾向を示し、最終的には平均35%に至っていた (図-6 B)。一方、遮光群のそれは、約20%強の割合のまま推移し、通常処理群と明瞭に異なった。分散分析の結果、有意な処理の効果が後半の2時点において検出された (表-2, $p < 0.05$)。

Epidermis tissue (表皮組織厚の割合) については、Mesophyll cellにおいて認められた傾向とは逆転した傾向があり、通常条件群においてのみ時系列に沿って減少するパターンがあった (図-6 C)。いずれの処理・時点においても平均10%以下で推移したが、ばらつきが相対的に大きかったこともあり、有意な処理の効果は検出されなかった (表-3)。

Palisade/Mesophyll (葉肉細胞厚に対する柵状組織厚の割合) における応答は、Mesophyll cellやPalisade tissueにおいて

表-2 トドマツの当年葉内部構造 (葉肉細胞・柵状組織) に関するANOVA

Date	Mesophyll cell				Palisade tissue			
	df	MS	F-value	p-value	df	MS	F-value	p-value
6/20	1	22.40	0.73	0.44	1	5.00	0.72	0.44
7/18	1	0.10	0.00	0.96	1	8.33	0.39	0.56
8/21	1	63.30	4.03	0.12	1	149.23	11.83	0.03
10/2	1	83.08	7.43	0.05	1	320.6	12.37	0.03

日付は2019年。Mesophyll cellは針葉厚に対する葉肉細胞厚の割合を、Palisade tissueは針葉厚に対する柵状組織厚の割合を解析に用いた結果であることを示す。表中の記載は表-1に準ずる。

表-3 トドマツの当年葉内部構造（表皮細胞・柵状組織/葉肉細胞）に関するANOVA

Date	Epidermis tissue				Palisade/Mesophyll			
	df	MS	F-value	p-value	df	MS	F-value	p-value
6/20	1	4.15	1.81	0.25	1	1.04	0.09	0.78
7/18	1	1.04	0.09	0.78	1	10.31	0.47	0.53
8/21	1	9.05	1.70	0.26	1	122.68	4.64	0.10
10/2	1	18.69	5.18	0.09	1	281.1	13.71	0.02

日付は2019年。Epidermis tissueは針葉厚に対する表皮組織厚の割合を、Palisade/Mesophyllは葉肉細胞厚に対する柵状組織厚の割合を解析に用いた結果であることを示す。表中の記載は表-1に準ずる。

認められた傾向と一貫していた。すなわち、通常条件群においてのみ時系列に沿った顕著な増加が認められ（図-6D）、遮光群のみが平均25%前後の値で推移した。有意な処理の効果は、サンプリングの最終時点においてのみ認められた（表-3, $p < 0.05$ ）。

考察

トドマツでは異なる光強度に対する葉の形態形質、内部構造の応答が、野外に生育する実生・稚樹を中心に報告されるが（Kitao et al. 2018; 野口ら 2003; 高橋 1969）、光条件変化に対するそれらの馴化応答について、当年葉の発達に伴った形態形質や内部構造の変化とともに把握する試みはなかった。個体数は限られるものの、本報告は急激に暗くなる光条件変化に対する速やかな当年葉の馴化応答についての基礎的知見となる。

トドマツ当年葉の1成長期間を通じた観察より、遮光処理によるLMA増加の顕著な抑制（図-4; 表-1）、ならびに、柵状組織の発達抑制（図-6; 表-2, 3）が明らかになった。一方、LAにおいては処理に関連した差異は観察されず、光条件変化に対して当年の個葉サイズでは応答しえないこともわかった（図-5; 表-1）。これは、展葉が済んだタイミングで遮光処理を実施したため、遮光開始までに個葉サイズが規定されていたものと考えられた。トドマツは固定成長型の樹種に分類されており、前年の夏期の光条件で葉の枚数が規定される特性を有する（Kimura et al. 1998）。シュート形態が決まっていることから、葉サイズといった形態的特性は展葉が済んでから変化させることが困難で、柔軟な応答ができないことを示唆する。

LMAの経時的測定より、通常の全天の光条件下に生育するトドマツは、成長期を通して個葉あたりの重量を大きくしていく推移パターンを認めることができた（図-4A）。それに対して、急激に暗くなることで、経時的な推移パターンが変わり重量の増加が止まる応答がもたらされていた。重量変動は葉厚の変化と内部構造の変化の2通りに解釈される。本研究では、葉の内部構造において、通常の光条件下の個体は成長期を通して徐々に柵状組織の割合を増加させる推移パターンがあることを明らかにすると同時に、暗くなる方向への光条件変化によって柵状組織の相対的な発達が止まるという応

答があることも明らかにした（図-6B, D）。柵状組織の発達は葉組織内における細胞間隙の減少、すなわち細胞の充填につながるため、重量の増加と深く関わる。しかしながら、LMAについては遮光後すぐの段階で通常条件群と遮光群間で違いが生じていたものの、柵状組織の発達については成長期終盤になって2つの群間の違いが現れており、重量の増加と柵状組織の発達それぞれに応答が認められるタイミングに時間的な相違があったことは特筆すべきである。このことはすなわち、重量変動の馴化応答は内部構造の変化だけでは説明できないことを意味する。本研究では技術的課題ゆえ厚さの値が得られなかったために示唆にとどまるものの、速やかな重量変動は、おそらく針葉全体の厚みの変化、ないし葉厚の発達制御が寄与したものと考えられた。一方で、通常は季節を通じてLMA増加がみられる中で、遮光下の個体のLMAが低く維持されていた点に関しては、柵状組織の発達抑制によって矛盾なく説明できると考えられる。

なお、柵状組織の相対的な発達は、透過する光の効率的な獲得や葉緑体ごとのCO₂濃度の勾配を緩衝する効果があり、最大光合成速度の増加に寄与すると一般に考えられている（寺島 2013）。光条件が優れない場合には光合成速度をおさえて光補償点を小さくする必要があるので、光条件変化に伴い、柵状組織といった内部構造が変化することは順応的な応答といえる。ただし、常緑葉では展葉後の葉緑体の充填が遅いことが知られていて（Miyazawa et al. 1998）、葉緑体の充填と葉組織の内部構造の発達は連動している可能性も指摘されることから（Oguchi et al. 2003）、内部構造の変化は光条件の変化に対する速やかな応答には不向きな機構かもしれない。トドマツは、1成長期内の数ヶ月といった時間スケールで光条件の変化に応答し、成長期後半や翌年において効率的な光合成応答を実現している可能性がある。今後の研究では、本研究で示された内部構造変化と光合成能といった生理的特性の関連性についても評価する必要がある。

また、個葉形態の構造特性は種間差が大きく、その制御タイミングも種によって異なることが指摘される（Oguchi et al. 2018）。前年のうちに内部構造が規定される樹種の場合、もしも良好な光条件下に生育するならば、翌年も展葉直後から効率的に資源獲得ができるような制御がはたらいて有利なことが期待されるが、突発的な被陰といった光条件変化へは順応

できず不利になる。一方、展葉後の光条件に合わせて可塑的に内部構造を変化させられる種特性を有する場合には上記の有利／不利は逆転し、光条件の変化に対してより適応的となる。本研究ではその観察数が限られるが、アカエゾマツはトドマツとはほぼ同様な応答が観察され、類似した光条件への馴化応答を有するとみられた。一方で、エゾマツの場合には遮光下の個体でもLMAが増加していく傾向があり、他種とは異なる応答を示した。同種は光条件の変化に順応できなかった可能性があり、実際に成長期の途中で遮光下の個体が枯死した。エゾマツは展葉が早かったため、この応答がフェノロジーの違いによるのか種特性によるのかは不明だが、同所的に生育する3種の生態を理解する上で興味深い応答である。本試験は、3種の展葉が済んだタイミングで実施しており、近隣個体の展葉、もしくは周囲の植生の繁茂による被陰を模している。このことから、特定のタイミングでの被陰に対する種間差の存在が示唆される。被陰のタイミングがずれた場合にも一貫した種間差があるのか、今後のさらなる検証が求められる。

まとめ

本研究では北方系の針葉樹3樹種の苗木を対象とし、とくにトドマツに着目しながら、個葉の形態形質と解剖学的な内部構造について遮光処理に対する応答を観察した。トドマツの当年葉は、急激に暗くなる光条件変化の直後に顕著なLMA増加の抑制がみられ、速やかな馴化応答があることがわかった。また、成長期を通じたゆるやかな応答ではあるが、同種では遮光によって柵状組織発達の抑制もみられ、適応的な内部構造変化も生じることが示唆された。葉内構造と対応させた生理機能に関して知見が整理されているが(寺島 2013)、葉の細胞サイズや組織発達を制御する遺伝的機構はモデル植物による研究例が多く(市橋 2016)、木本種での理解は進んでいない。トドマツは様々な機能的形質に遺伝的な変異がみられることが報告されており(Eiga and Sakai 1987; 畠山 1981; Ishizuka et al. 2015)、その遺伝的基盤についても基礎的な情報が整備されつつあることから(Goto et al. 2017)、遺伝的機構に迫る好適材料として期待できる。著者らは、トドマツの産地別苗を用いて、光条件変化への応答に関するさらなる実験的検証、ならびに、応答の地域差を調べており、環境応答とその意義について、現象面・遺伝的機構の面からさらなる解明を進めている。

謝辞

形態形質の測定にあたっては菅野瞳氏にご協力いただき、内部構造の測定にあたっては、北海道大学農学研究院の渡邊陽子博士から実験指導をいただきました。ここに記して感謝いたします。本研究はJSPS科研費(19K06150)、特別研究員奨励費(18J2031908)の援助を一部受けた。

引用文献

- Brooks, JR., Hinckley, TM., and Sprugel, DG. (1994) Acclimation responses of mature *Abies amabilis* sun foliage to shading. *Oecologia* 100: 316–324
- Brooks, JR., Sprugel, DG., and Hinckley, TM. (1996) The effects of light acclimation during and after foliage expansion on photosynthesis of *Abies amabilis* foliage within the canopy. *Oecologia* 107: 21–32
- Eiga, S. and Sakai, A. (1987) Regional variation in cold hardiness of Sakhalin fir (*Abies sachalinensis* Mast.) in Hokkaido, Japan. In: Li, P. H. (Ed.) Plant cold hardiness. Alan R. Liss Inc., New York, pp 169–182
- 藤村好子・坂上幸雄 (1977) トドマツの比葉面積 (Specific leaf area) の変動. 日本林学会北海道支部講演集 25: 22–23
- 福地稔・水井憲雄・菊沢喜八郎・水谷栄一 (1982) トドマツ人工林の天然下種更新 (III) 固定試験地における8年間の稚苗の推移. 北海道林業試験場研究報告 20: 21–29
- Goto, S., Kanegae, H., Ishizuka, W., Kitamura, K., Ueno, S., and Hisamoto, Y. (2017) Genetic mapping of local adaptation along the altitudinal gradient in *Abies sachalinensis*. *Tree Genetics & Genomes* 13: 104
- 畠山末吉 (1981) トドマツの産地間変異の地域性に関する遺伝育種学的研究. 北海道林業試験場研究報告 19: 1–87
- 彦坂幸毅 (2016) 植物の光合成・物質生産の測定とモデリング. 127pp. 精興社, 東京
- 北海道 (2017) 北海道採種園整備方針. 10pp. 北海道, 札幌
- 北海道水産林務部 (2020) 平成30年度北海道林業統計. 100pp. 北海道水産林務部, 札幌
- 市橋康範 (2016) 葉の進化発生学的研究について考える. 植物科学最前線 7: 288
- Ishizuka, W., Ono, K., Hara, T., and Goto, S. (2015) Influence of low- and high-elevation plant genomes on the regulation of autumn cold acclimation in *Abies sachalinensis*. *Frontiers in Plant Science* 6: 890
- Kimura, K., Ishida, A., Uemura, A., Matsumoto, Y., and Terashima, I. (1998) Effects of current-year and previous-year PPFDs on shoot gross morphology and leaf properties in *Fagus japonica*. *Tree physiology* 18: 459–466
- Kitao, M., Harayama, H., Han, Q., Agathokleous, E., Uemura, A., Furuya, N., and Ishibashi, S. (2018) Springtime photoinhibition constrains regeneration of forest floor seedlings of *Abies sachalinensis* after a removal of canopy trees during winter. *Scientific Reports* 8: 6310
- Kitao, M., Kitaoka, S., Harayama, H., Agathokleous, E., Han, Q., Uemura, A., Furuya, N., and Ishibashi, S. (2019) Sustained growth suppression in forest-floor seedlings of Sakhalin fir associated with previous-year springtime photoinhibition after

a winter cutting of canopy trees. *European Journal of Forest Research* 138: 143–150

小池孝良 (2004) 樹木生理生態学. 280pp. 朝倉書店, 東京

Miyazawa, S., Satomi, S., and Terashima, I. (1998) Slow leaf development of evergreen broad-leaved tree species in Japanese warm temperate forests. *Annals of Botany* 82: 859–869

水井憲雄・菊沢喜八郎・浅井達弘 (1979) トドマツ人工林の天然下種更新 (I) 4年間の稚苗消長について. 北海道林業試験場報告 17: 13–22

野口麻穂子・香山雅純・吉田俊也・小池孝良 (2003) 冬山造林を行った地域におけるトドマツ前生稚樹の光合成特性. *日本林学会北海道支部論文集* 51: 36–38

Oguchi, R., Hikosaka, K., and Hirose, T. (2003) Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy?. *Plant, Cell & Environment* 26: 505–512

Oguchi, R., Onoda, Y., Terashima, I., and Tholen, D. (2018) Leaf anatomy and function. *In: Adams III, W. W. and Terashima, I. (Eds.) The leaf: a platform for performing photosynthesis.* Springer, Cham, pp 97–139

R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing

坂上幸雄・藤村好子 (1981) トドマツ・アカエゾマツ苗の光合成速度, 呼吸速度の季節変化. *日本森林学会誌* 63: 194–200

高橋邦秀 (1969) 天然生トドマツ稚苗の葉の解剖学的性質とクロロフィル含有量について. *日本林学会北海道支部講演集* 17: 69–72

寺島一郎 (2013) 植物の生態 -生理機能を中心に-. 268pp. 裳華房, 東京

Summary

In order to understand the acclimation responses of Sakhalin fir (*Abies sachalinensis*) to rapid changes in light environment, the shade-treatment group of fir seedlings were covered by a blackout curtain after leaf spreading, and the morphology and anatomy of current needle leaves were evaluated along the growth period. The LMA (leaf mass per area) of fir was measured using the current leaves obtained in time-interval sampling that started from the timing of bud flush. The LMA of Sakhalin spruce (*Picea glehnii*) and Yezo spruce (*P. jezoensis*) were also measured for preliminary comparison. For fir seedlings at four time points from June to October, sections of leaves were made to determine its anatomical structure by image analysis. A distinct increment in LMA was observed in all species from June to early July, whereas the LMA of fir seedlings under shade treatment significantly lower than that under the control group (ambient light). Consistent LMA was also

observed in Sakhalin spruce. For fir seedlings under shade treatment, almost constant values were obtained in two anatomical traits throughout our monitoring period: (i) the proportion of palisade tissue thickness to needle leaf thickness and (ii) the proportion of palisade tissue thickness to mesophyll cell thickness. In fir seedlings in the control group, these values increased over time, and a significant difference was observed from the samples in October (4th sampling). Based on the results, the observed morphological change in leaves seems to be responsible for the rapid acclimation response to shade. Moreover, because the timing of anatomical change in cell or tissue was later for a few months than that of the morphological change, it is suggested that the control of the development of leaf thickness is the possible mechanism of rapid acclimation response.

Key words

change of light condition, acclimation, LMA, palisade tissue, conifer