

ヒバ芽生えの葉の光化学系Ⅱ反応に及ぼす 土地栄養条件の影響

加藤 司*・橋本良二**

Effect of soil nutrition condition on Photosystem II reactions of
juvenile seedlings of *Thujaopsis dolabrata* var. *hondai* Makino

Tsukasa KATOU and Ryoji HASHIMOTO

1. はじめに

育苗はもとより広く森林更新の場で、樹木芽生えの生理特性は必要不可欠な情報の一つである。光合成器官が大きな比率を占める芽生えでは、発達した苗木や立木と比べ、個体の成長反応はより強く葉の光合成特性に依存していると考えられる。針葉樹については、ヒバに限らず、芽生えの葉の光合成を"*in vivo*"で非破壊的に測定した例はきわめて限られている (Hashimoto et al., 2006)。これは、針葉樹では子葉や初生葉の大きさが概して小さく、チャンバーを用いたガス交換測定法がほとんど不可能なためである。このような材料に対しては、クロロフィル蛍光法が最適のツールになる (橋本, 2003)。

本法では、一連の測定で得られる蛍光強度をもとに、クロロプラストのLHCⅡで発生する光励起エネルギーの光化学的消費と非光化学的消費が量的に評価される (Genty et al., 1989; Schreiber et al., 1994)。生態生理の分野では、光化学的および非光化学的消費を示すパラメータとして、ETRあるいはNPQがよく用いられる (Han et al., 2004; Chakrabarty et al., 2006)。ETRとNPQは、光強度の増大にともない上昇し、CO₂固定能力の低い植物では比較的低い光強度で飽和値 (ETR_{max}, NPQ_{max}) を示す (Björkman and Demmig-Adams, 1994)。ETR_{max}は葉のCO₂固定能力との高い相関が予想され、NPQ_{max}は光過剰状態で発生する生体

Received January 17, 2007

Accepted February 13, 2007

* 岩手大学大学院農学研究科農林環境科学専攻

** 岩手大学農学部農林環境科学科森林科学講座

損傷に対する防御能力を示すと考えられている (浅田, 1999)。

しかし、クロロフィル蛍光分析のパラメータが生育環境条件によりどのように変化するかについては現在でも不明な点が多く、とくにNPQの変化についてはほとんどわかっていない。クロロフィル蛍光の測定が、コンパクトで迅速そして高精度でおこなえるに至ったにもかかわらず、フィールド研究にあまり活用されていないのは、一つにはこうした事情が関係していると考えられる。また、パラメータが樹種間でどのように変化するかについては、樹種の立地特性と密接に関係するとみられ、栄養条件と関連づけて並行して検討しておく必要がある。

ヒバの育苗や森林更新の技術的課題の解決に資することを目的として、本研究ではヒバ芽生えについて光化学系Ⅱの二つのパラメータ ETR_{max} と NPQ_{max} の土地栄養条件に対する変化パターンを明らかにすることとした。スギでも同様の測定をおこない、比較対象とした。二つのパラメータが栄養条件で変化する生理的な理由、また二つのパラメータの樹種間差が樹種の立地特性とどう結びつくかについて若干の考察をおこなった。

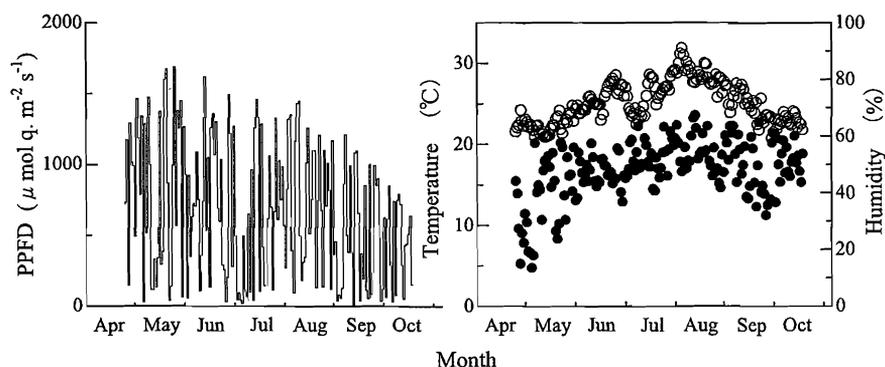
II. 材料と方法

1. 材料と生育条件

ヒバ種子は、青森県農林総合研究センター十和田圃場の採種園で2004年秋に採取したものをを用いた。スギ種子は、岩手県林木育種場が2005年春に配布したものをを用いた。プラスチック製白色角型プランター (24×12×11cm) に市販の園芸用鹿沼土を入れ、2005年4月に播種した。播種量はプランターあたりスギ、ヒバでそれぞれ約1500, 2000粒とし、発芽時期がそろうようにヒバ、スギの順に播種した。プランターの数は、各樹種8個とした。プランターは、給水時等に生じる底部からの流出水を溜めるための受け皿を下に置き、実験室南側窓辺に設置されたプランター台に並べた。できるだけ自然光が入るようにするとともに、人工光 (昼光色蛍光灯) で13時間の補光をおこなった。人工光の照射光強度 (光合成有効光量子束密度, PPF) は、約 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。播種後は、培地表面が乾かないようにこまめに給水をおこなった。5月上旬から中旬にかけて、両樹種とも発芽した。

発芽後は、給水とともに、液体肥料を与えた。液肥は、市販の園芸用液体複合肥料 (ハイポネックス5-10-5液, 村上物産) を原液とし、液肥をまったく与えず代わりに水を与える培地, 2000, 1000, 500倍の希釈液を与える培地を設けた。これらの培地を、それぞれ培地A, B, C, Dと呼ぶ。芽生えの成長状態を観察しながら、2~3週間おきに各プランターで500mlの投与をおこなった。なお、育成期間中、芽生えどうしの光競合を緩和するため適宜間引きをおこなった。

育成期間中、光量子センサー (IKS-25, 小糸, 東京) を用い10分間隔でPPFDを記録し、温湿度測定器 (TR-72, T and D, Matsumoto) を用い30分間隔で気温と相対湿度を記録した。



図一 1. 芽生えの生育期間における光合成有効量子束密度 (PPFD) と温湿度の推移
PPFDは9時から15時までの平均, 気温 (白丸) と相対湿度 (黒丸) は日平均。

図一 1 に、育成期間中における日中の平均PPFDおよび日平均気温と相対湿度の推移を示す。

2. クロロフィル蛍光の分析

1) 試料葉

ヒバでは、子葉とほぼ同時に約10対の小さな初生葉が発生し、それらが展開完了後数週間して鱗片葉の形成が始まった。スギでは、子葉展開完了後数週間して初生葉が発生した。芽生えの発達において、ヒバでは鱗片葉、スギでは初生葉の光合成生産がとくに発芽当年の初期乾物成長に大きく関与するので、それらをクロロフィル蛍光の測定対象とした。培地栄養処理の効果が8月から9月にかけて成長量や葉色などの面で目立ってきたことを確かめ、10月初旬より測定をおこなった。測定は個体ごとにおこない、各樹種各処理で10個体を選んだ。ヒバではひとつかたまりの鱗片葉、スギでは一枚の初生葉について、測定した。いずれの測定でも、十分展開し切った成熟葉を選んだ。

2) 光曲線の測定

測定前日の夕方、プランターを実験室の暗所におき、十分給水し一晩おいた。蛍光分析は、クロロフィル蛍光分析計 (MINI-PAM, Heinz Walz, Germany) を用いておこなった。まず、 F_0 、 F_m を測定した後、活性光の強度を段階的に $1500 \mu \text{mol q. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 付近まで上げ、各段階で蛍光強度が安定するのを待って (8~15分)、を測定した。ここで、 F_0 、 F_m はそれぞれ暗黒状態での (初発) 蛍光強度、暗黒状態での最大蛍光強度であり、 F 、 F_m' それぞれ活性光照射状態での蛍光強度、最大蛍光強度である。最大蛍光強度を求める際の飽和光の強度は約 $6000 \mu \text{mol q. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、照射時間は0.8秒とした。活性光の照射はスライドプロジェクターでおこない、光源 (JCD, 100V150WM, PHILIPS, 東京) に加える電圧で光強度を調節した。活性光強度は、光量子センサー (LI-190S, LI-COR, USA) で測定した。屋外の空気をエアポンプで引き込み、ビニール管を通して試料葉にあて、試料葉の外囲の炭酸ガス濃度および葉温

の上昇を抑えた。測定中の炭酸ガス濃度は $370\sim 390\ \mu\text{l l}^{-1}$ 、葉温は $20\sim 24^\circ\text{C}$ の範囲にあった。なお、本研究では、各パラメータと光強度との関係を光曲線と呼んでいる。

3) パラメータ

F_v/F_m ($F_v = F_m - F_0$) は暗順応下におけるPS IIの光化学的効率(最大量子収率)で、光ストレスを生じていない状態では、 $0.8\sim 0.83$ の値を示す(Schreiber et al., 1994)。 $(F_m' - F)/F_m'$ は、活性光下での光化学的効率(量子収率)を表わす。活性光下におけるクロロフィル励起エネルギーの光化学的消費量を表わすパラメータとして、電子伝達速度(ETR)が用いられる。

$$\text{ETR} = 0.5 a I (F_m' - F) / F_m' \quad (1)$$

ここで、 I は葉に照射される光エネルギーの強度(PPFD, $\mu\text{mol q. m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)、 a は葉における光エネルギー吸収率で一般に 0.84 が採用される。 0.5 は光化学系Iと光化学系IIの間における光化学系IIへの光エネルギー配分比である。一方、活性光下における励起エネルギーの非光化学的消費量を表すパラメータとして、NPQが用いられる。

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m' \quad (2)$$

各培地で得られたクロロフィル蛍光分析のパラメータについては、一元配置分散分析、Fisherの最小有意差法による多重検定をおこなった。これらの統計には、統計ソフトウェア(Excel Statistics 2002 for Windows, SSRI, Tokyo)を用いた。

III. 結果

1. 光曲線の一例

図-2に、ETRとNPQの光曲線の測定例を示す。ETRは、弱光下では直線的に上昇するが、

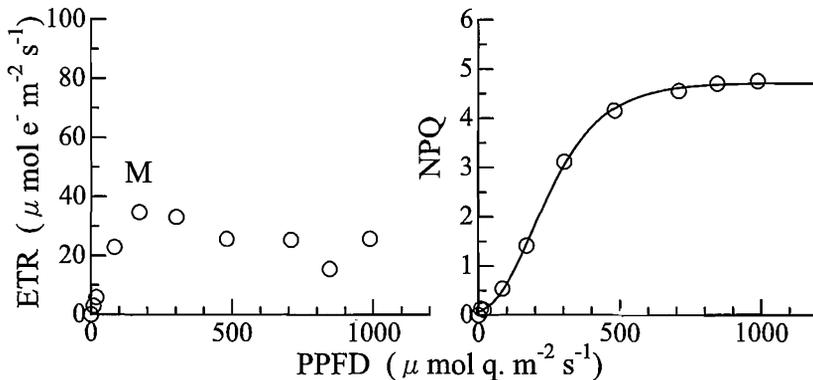


図-2. ヒバ芽生えで得られたETRおよびNPQ光曲線の一例
ETR光曲線のMは最大値(ETR_{max})を表す。NPQ光曲線はGomperz関数,
 $y = a \exp(-b \exp(-c x))$, で近似した。 $a=4.714$, $b=4.228$, $c=7.489 \times 10^{-3}$

やがて光飽和域に達し最大値 (ETR_{max}) を示した。NPQは、弱光下では上昇はわずかであるが、やがて顕著になり、最終的には一定値 (NPQ_{max}) に収束した。NPQ光曲線は、Gomperz関数でよく近似された。本研究では、 ETR_{max} は測定で得られた最大値とし、 NPQ_{max} はGomperz関数が与える収束値を採用した。

2. 培地栄養条件が光曲線に及ぼす影響

ヒバとスギの各培地で得られたETR光曲線とNPQ光曲線の測定データを、図-3, 4に示す。ETR曲線は、スギ、ヒバとも培地により異なっていた。培地A, Bでは、強光域でETRの低下が認められた。NPQ曲線は、培地内での変動が大きく、培地間のちがいはETR曲線に比べあまり明瞭ではなかった。

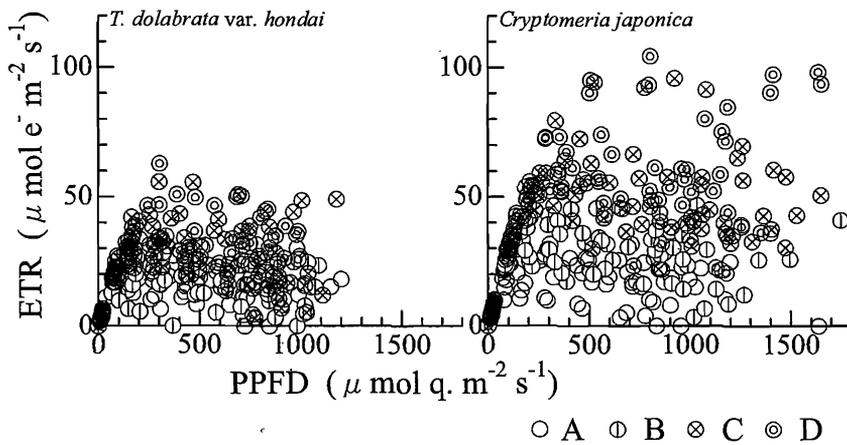


図-3. ヒバとスギにおける各培地栄養条件でのETR光曲線

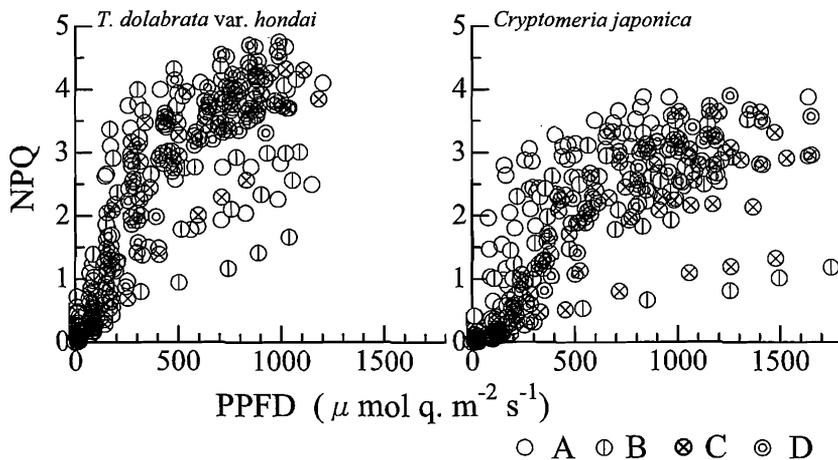


図-4. ヒバとスギにおける各培地栄養条件でのNPQ光曲線

ヒバとスギについて各培地で得られた ETR_{max} と NPQ_{max} を, 表-1, 図-5に示す。 ETR_{max} は, ヒバでは培地Aで小さく, 培地C, Dで大きかった。スギでは, 培地A, Bで小さく, 培地C, Dで大きかった。 ETR_{max} の培地間の変動幅は, ヒバで小さくスギで大きかった。各培地における ETR_{max} の樹種間のちがいは, 培地Aでは有意差はなかったが, 培地B, C, Dではヒバで小さかった。一方, NPQ_{max} は, ヒバでは培地A, Bに比べ培地C, Dで大きいようであったが, 有意ではなかった。スギでは培地Bで小さく, 培地Dで大きかった。各培地における NPQ_{max} の樹種間のちがいは, ETR_{max} と同様で, 培地Aでは有意差はなかったが, 培地B, C, Dではヒバで大きかった。

IV. 考 察

1. 培地栄養条件による変動パターン

ETR_{max} は培地栄養条件で異なり, 養分量の増大につれて上昇した(表-1, 図-5)。培地の栄養条件は, 植物体内への窒素などの無機養分の吸収量を通して葉のクロロフィル濃度やRubiscoなどの光合成に関係する酵素濃度に支配的に働く(Nakaji et al., 2001; Warren et al.,

表-1. 培地の栄養条件が ETR_{max} および NPQ_{max} に及ぼす影響

Nutrition	n	$ETR_{max} (\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})$			NPQ_{max}		
		<i>T. dolabrata</i> var. <i>hondai</i>	<i>C. japonica</i>	t	<i>T. dolabrata</i> var. <i>hondai</i>	<i>C. japonica</i>	t
A	10	21.03 ^B ± 6.43	25.01 ^B ± 7.63	1.26	3.50 ± 0.83	3.19 ^{a,b} ± 0.42	1.05
B	10	26.07 ^{A,B} ± 7.84	36.94 ^B ± 7.66	3.13**	3.41 ± 0.91	2.54 ^b ± 0.68	2.43*
C	10	35.96 ^A ± 9.82	60.26 ^A ± 15.06	4.27**	3.78 ± 0.40	2.75 ^{a,b} ± 0.67	4.19**
D	10	34.84 ^A ± 9.01	68.50 ^A ± 17.28	5.46**	4.16 ± 0.60	3.28 ^a ± 0.43	3.74**

データは平均値と標準偏差。処理間で多重比較(Scheffé法), 樹種間で平均値の差の検定(Welch法)をおこなった。異なるアルファベットは有意差(大文字 $p < 0.01$, 小文字 $p < 0.05$)を表わす。

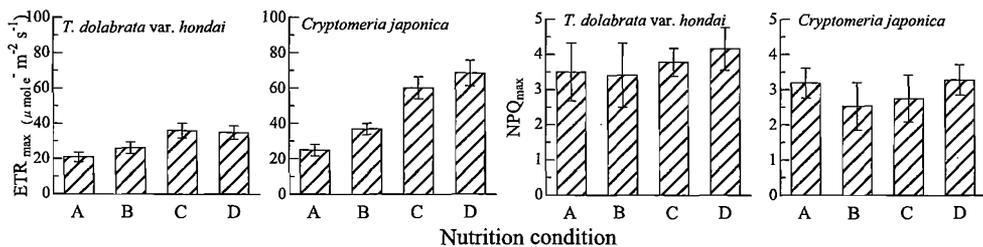


図-5. ヒバとスギにおける各培地栄養条件での ETR_{max} および NPQ_{max} 平均値と標準偏差を示す。

2003; 白旗ら, 2005)。葉のクロロフィル濃度は、各LHC（集光性クロロフィルタンパク複合体）に配分される光エネルギー量を通して、クロロフィル励起エネルギー捕捉率に直接に関与する（Schreiber et al., 1994）。また、Rubisco濃度は、葉緑体ストロマにおけるCO₂とO₂の還元を通して、クロロフィル励起エネルギーの光化学消費能力に直接に関与する。したがって、培地栄養条件によるETR_{max}のちがいは、葉のクロロフィル濃度やRubisco濃度のちがいを強く反映していると考えられる。

一方、NPQ_{max}も、培地栄養条件で異なっていた（表-1, 図-5）。検討を要するが、NPQ_{max}は培地養分量がある程度低いレベルで最低となり、養分量がそれより少なくなる、あるいは多くなると増大するようであった。何れにしても、ETR_{max}のように培地養分量の増大に応じて単純に上昇するわけではない。NPQは、ある光強度を超えると、LHCIIにおけるキサントフィルサイクルによる熱消散に大きく依存することから（Schreiber et al., 1994; 浅田, 1999）、NPQ_{max}のちがいはキサントフィル濃度あるいはカロテノイド濃度、それらの濃度とクロロフィル濃度との量的関係が密接にかかわっていると考えられる（Martinez-Ferri et al., 2004; Sveshnikov et al., 2006）。

クロロフィルが吸収した光エネルギーは、ごく一部は蛍光発生で消費されるが、ほとんどは光化学消費と非光化学消費（熱消費）にまわされる。ETRは光化学消費全体を表わし、NPQも非光化学的消費のうちの相当大きな部分（強光域ではおそらく半分あるいはそれ以上）を表わすとみられる（浅田, 1999）。図-6に示すように、各培地栄養条件ごとにETR_{max}とNPQ_{max}との関係は双曲線で示されるようであった。養分量の少ない培地では、低いETR_{max}

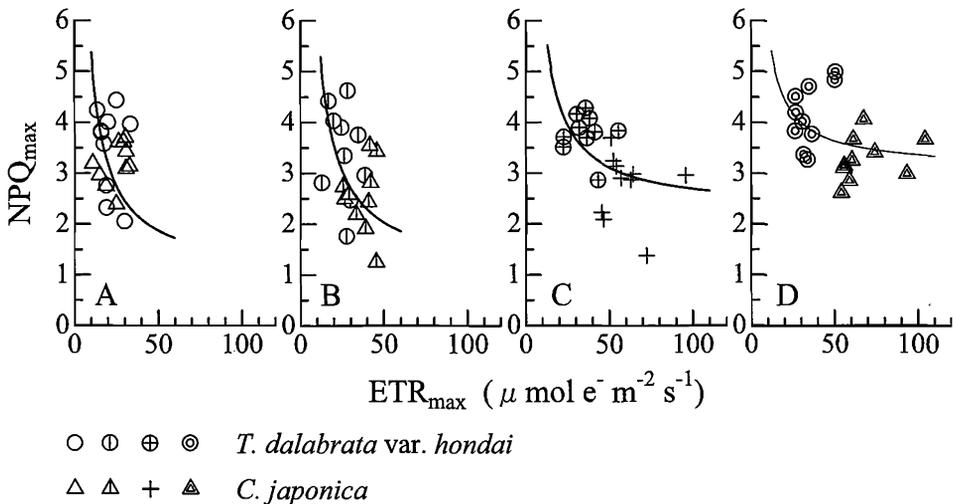


図-6. 各培地栄養条件におけるETR_{max}とNPQ_{max}との関係

両者の関係は $y = 1 + b/x$ で回帰した。各培地条件 (A, B, C, D) の b はそれぞれ 4.38, 5.15, 4.21, 2.80。

をもつものは NPQ_{max} を大きく高めるのに対し、養分量の多い培地では、 ETR_{max} の低下にもなう NPQ_{max} の上昇はそれほど顕著ではなかった。これは、少ない養分量のもとでは、 NPQ_{max} の上昇が生理的に重要な意味をもつことを示唆している。

2. 樹種間の変動

ETR_{max} は、ヒバ、スギともに培地Aで低く、培地Aでは両樹種間で有意なちがいはなかったが、培地B, C, Dではすべてヒバで小さかった。また、ヒバでは培地C、スギでは培地Dで最大値を示し、培地Aに対する比率はそれぞれ1.7, 2.7であり、ヒバで小さかった。これらの結果から、培地の養分量の増大が ETR_{max} の上昇をもたらす効果は、ヒバはスギに比べ相当低い。一方、 NPQ_{max} については、何れの培地においてもヒバはスギに比べ大きな値を示した(培地Aでは有意ではなかったが)。樹種間の CO_2 固定能力のちがいはよく知られているが、光化学系IIにおける熱消費機構の面でも樹種間に明らかなちがいがある (Hashimoto et al., 2006)。

ETR_{max} と NPQ_{max} との双曲線関係から(図-6)、培地養分条件にかかわらず、スギは高 ETR_{max} 低 NPQ_{max} 型であるのに対し、ヒバは低 ETR_{max} 高 NPQ_{max} 型と言える。これは、光化学系IIが、ヒバではスギに比べ、熱消費により大きく依存した光防御的な対応をとっていることを意味する。上述の、培地養分量の増大にともなう ETR_{max} 上昇効果がヒバで小さいことと考えあわせ、ヒバはスギに比べストレスを誘導する環境に対し回避性よりは耐性を強めて対応するようである。

引用文献

- 浅田浩二 (1999) 葉の光環境変動に対する迅速適応. (渡邊 昭・篠崎一雄・寺島一郎監修「植物の環境応答」). 107-119, 秀潤社, 東京.
- Björkman, O., Demmig-Adams, B. 1994. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In "Ecophysiology of Photosynthesis" (ed. Schulze, E., Caldwell, M.M.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 17-47.
- Chakrabarty, D., Park, S. Y., Ali, M. B., Shin, K. S. and Paek, K. Y. (2006) Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology* 26, 377-388.
- Genty, B., Briantais, J., Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990,87-92.
- Han, Q., Katahata, S., Kakubari, Y., Mukai, Y. 2004. Seasonal changes in the xanthophyll cycle and antioxidants in sun-exposed and shaded parts of the crown of *Cryptomeria*

- japonica* in relation to rhodoxanthin accumulation during cold acclimation. *Tree Physiology* 24: 609-616.
- 橋本良二 (2003) クロロフィル蛍光法によるヒバ芽生えの光合成測定. 岩手大学農学部演習林報告 34: 81-89.
- Hashimoto, R., Katou, T. and Shirahata, M. (2006) Light responsibility of juvenile seedlings of *Thujaopsis dolabrata* var. *hondai* Makino evaluated from chlorophyll a fluorescence analyses. *Environmental Control of Biology* 44: 233-244.
- Martinez-Ferri, E., Manrique, E., Valladares, F., Balaguer, L. 2004. Winter photoinhibition in the field involves different processes in four co-occurring Mediterranean tree species. *Tree Physiology* 24: 981-990.
- Nakaji, T., Fukami, M., Dokiya, Y. and Izuya, T. (2001) Effects of high nitrogen load on growth, photosynthesis and nutrient status of *Cryptomeria japonica* and *Pinus densiflora* seedlings. *Trees* 15: 453-461.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In "Ecophysiology of Photosynthesis" (ed. Schulze, E., Caldwell, M.M.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p 49-70.
- 白旗 学, 橋本良二, 高島輝之 (2005) アカマツとスギ芽生えの子葉のRubisco含量と施肥の影響. 東北森林科学会誌 10: 1-7.
- Sveshnikov, D., Ensminger, I., Ivanov, A. G., Campbell, D., Lloyd, J., Funk, C., Huner, N. P. A and Oquist, G. (2006) Excitation energy partitioning and quenching during cold acclimation in Scots pine. *Tree Physiology* 26: 325-336.
- Warren, C. R., Dreyer, E. and Adams, M. A. (2003) Photosynthesis-Rubisco relationships in foliage of *Pinus sylvestris* in response to nitrogen supply and the proposed role of Rubisco and amino acids as nitrogen stores. *Trees* 17: 359-366.