

高 CO<sub>2</sub> 下で成熟した葉の光合成活性に及ぼす土壤乾燥の影響

## —クロロフィル蛍光イメージングによる評価の検討—

森林総合研究所北海道支所 飛田博順・北岡 哲・上村 章・北尾光俊・丸山 温・宇都木 玄

## はじめに

近年、大気中の二酸化炭素濃度 (CO<sub>2</sub>) が上昇し続けている (5)。気温の上昇により降雨の季節性が変化し、夏期に降雨量が減少することも予想されている (3)。高 CO<sub>2</sub> 環境下で生育した樹木の気孔コンダクタンスは、通常の CO<sub>2</sub> 下と比べて低下するため、光合成の水利用効率 (光合成速度/蒸散速度) が上昇する (12)。一方、高 CO<sub>2</sub> 下で生育した葉の水分特性では、通常の CO<sub>2</sub> 下と比べて飽水時の浸透ポテンシャルが高く、より湿潤な条件に対応した性質を示す場合がある (11)。この結果は高 CO<sub>2</sub> 下で発達した葉の乾燥耐性が通常の CO<sub>2</sub> 下で発達した葉より低いことを意味する。高 CO<sub>2</sub> による葉の乾燥耐性の低下の効果が大きい場合、土壤の乾燥によるストレスの程度が通常 CO<sub>2</sub> に比べて増加する可能性がある。

最大炭酸固定速度 (V<sub>max</sub>) などで示される光合成能力は、乾燥条件下で生育した葉のほうが湿潤条件下で発達した葉よりも上昇する場合がある (7,10)。高 CO<sub>2</sub> 下では主に養分不足や光合成生産物に関するシンク・ソースバランスの不均衡、葉内の糖類蓄積などにより光合成能力の低下 (ダウンレギュレーション) が生じる場合がある (1)。乾燥と高 CO<sub>2</sub> に対する光合成の反応が逆の反応になるため、乾燥条件下ではこの高 CO<sub>2</sub> の効果が緩和される可能性がある。一方、湿潤条件下では高 CO<sub>2</sub> 下で光合成能力の低下が生じやすくなると考えられる。

以上のことから、高 CO<sub>2</sub> 環境下では、湿潤条件下で発達した葉のほうが、乾燥条件下で発達した葉に比べると、より乾燥や強光のストレスを受けやすくなる可能性がある。そこで本研究では、「高 CO<sub>2</sub> 環境下の湿潤条件下で成熟した葉は、乾燥によるストレスを受けやすい」という仮説を立てた。樹種による反応の違いを明らかにするために、遷移系列上の位置や水分要求度の異なるシラカンバ、エゾノキヌヤナギ、ミズナラの3種を材料に用いた。本報告では、遷移初期種で北方の広範囲の立地環境に生息するシラカンバの結果を報告する。高 CO<sub>2</sub> 下でシラカンバのポット苗を生育させ、葉の成熟後に土壤乾燥処理を施し、光合成活性の変化を調べた。乾燥処理期間中に発達した葉の光合成活性も測定し、1ヶ月間の乾燥処理により湿潤環境で発達した葉に比べて光合成能力が上昇するという順化反応 (7,10) の有無を調べた。

本研究では、光合成活性の評価に Imaging-PAM MINI-version の利用を試みた。高 CO<sub>2</sub> に対する光合成反応には、養分不足やシンクソースバランスに関連して、葉内

の糖・デンプン類の蓄積が大きく関与している (1)。葉内物質の蓄積には面的な不均一性が見られる場合がある (6)。糖類の蓄積に葉の面的な不均一性がある場合、光合成活性の反応にも面的な不均一が生じることが予想される。これまでのガス交換とクロロフィル蛍光の同時測定では、測定部分の平均的な光合成活性の反応を知ることができる。Imaging-PAM を併用することにより、より細かな葉の部位間 (例えば主脈付近、側脈付近、脈の間など) の光合成活性の反応の違いを明らかにすることが可能となる。今回の報告では、まず面的な違いを評価する前段階として、Imaging-PAM による測定値 (平均値) の妥当性を評価する。

## 材料と方法

材料と実験設定: 材料にはシラカンバの1年生苗を用いた。21 cm のビニール製ポットに移植し、土壤には鹿沼土と赤玉土を1対1に混ぜた土を用いた。5月中旬から森林総合研究所北海道支所の環境調節施設において、2段階のCO<sub>2</sub>濃度(370 ppm (通常CO<sub>2</sub>)と720 ppm (高CO<sub>2</sub>))で生育させた。CO<sub>2</sub>処理は各処理ごとに3部屋用いた。各部屋10個体を週3回(500 ml/回)の灌水頻度で生育させた。施肥は実験開始時に遅効性の固形肥料(500 mgN 相当量)を与え、さらにハイポネックスを25 mgN 相当量/週で10回与えた。約2ヶ月後、各部屋の5個体の灌水頻度を週1回に減らして1ヶ月間生育させた(乾燥処理:dry)。残りの個体は週3回の灌水頻度を保った(コントロール:wet)。乾燥処理終了後、灌水頻度を週3回に戻した。

土壤乾燥処理中の光合成活性: 乾燥処理に伴う成熟葉の光合成活性の変化を追跡測定した。各部屋各処理2個体(1枚/個体)の老化の兆候を示していない成熟葉(センサス葉)を測定した(6個体/処理)。乾燥処理前と、乾燥処理期間中の灌水前と灌水翌日にImaging-PAM MINI-version (Walz, Effeltrich, Germany)によりクロロフィル蛍光を測定した。光合成活性に対する葉齢の影響を確認するために、wetの個体の測定を処理前、処理期間中、処理終了後の3回行った。

クロロフィル蛍光の測定時には、LI-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA)を用いて葉の下面のCO<sub>2</sub>濃度(370 ppmと720 ppm)と葉温(27°C)を調節した。LI-6400のチャンパーヘッド部分にImaging-PAMの測定台部分(葉ホルダーを設置する部分)を重ねて配置した(図-1a)。LI-6400(葉の裏面)とImaging-PAM(葉の表面)で葉

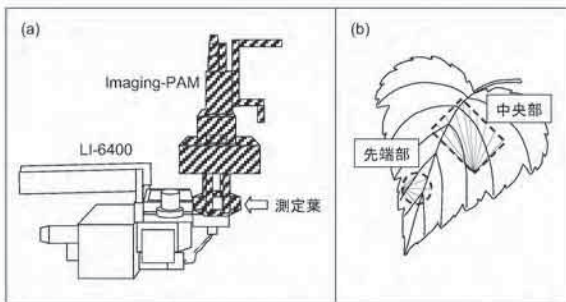


図-1 測定機器 (Imaging-PAM と LI-6400) の設置方法 (a) と対象葉の測定位置 (b)

を挟み測定を行った。LI-6400 のチャンバーヘッド部分の空気の循環口をふさいだ。葉の上側は開放状態となるため、ガス交換の測定は行わなかった。葉の中央部 (主脈の基部から約 50% 地点に相当する場所) と、先端部 (主脈の基部から約 75% 地点に相当する場所) の 2 カ所で測定を行った (図-1 b)。測定する位置に印を付け、できるだけ毎回同じ場所を測定した。測定範囲が  $2.4 \times 3.2 \text{ cm}$  に限られるため、主脈と側脈を含みできるだけ葉緑の方向へ広い範囲を含むように測定位置を決めた。

測定の前日に苗を実験室内の暗所に移動させた。まず葉の中央部について、dark-light Induction Curve の測定を行った。370 ppm  $\text{CO}_2$  の条件で飽和パルス光 (強度 10) を照射し  $F_0$  と  $F_m$  を測定し、 $F_v/F_m (= 1 - F_0/F_m)$ ; 光化学系 (PS) II での最大光量子収量を求めた。40 秒後に強度 8 の測定光 (Actinic light) ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  相当) を点け、飽和パルス光を 1 分間隔で照射した。測定光の光強度は弱光であるが、最も安定した光強度である (2) ことから採用した。15 分間以上経ち測定値の安定を確認した後、葉裏面の  $\text{CO}_2$  濃度を LI-6400 の設定で 720 ppm に上げた。測定値の安定を確認して測定を終了した。測定中は黒ビニール袋により測定光以外は葉に当たらないようにした。本研究では、"lake model" を元に算出されるクロロフィル蛍光パラメータ  $Y(\text{II})$ ,  $Y(\text{NPQ})$ ,  $Y(\text{NO})$  を用いた (4,9)。 $Y(\text{II}) (= 1 - F_v/F_m')$  は PSII での電子伝達の光量子収量を表し、測定した光環境での光合成活性の指標として用いた。 $Y(\text{NPQ}) (= F_v/F_m' - F_v/F_m)$  は PSII における制御された非光化学的消光 (熱放散) を表し、光防御機能の高さを反映する。 $Y(\text{NO}) (= F_v/F_m)$  は、PSII での制御されていない非光化学的消光を表し、過剰な光に対する防御能力の欠如を反映する (4,8)。

葉の中央部の測定後に、先端部の  $F_v/F_m$  の測定を行った。葉の中央部の測定中は暗処理用のリーフクリップ (DLC 8; Walz, Effeltrich, Germany) により先端部の暗条件を保った。Imaging-PAM での  $F_v/F_m$  測定後、再度、先端部に対してリーフクリップにより暗処理を 15 分以上行った。暗処理後、PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Germany) により  $F_v/F_m$  を再測定した。

本報告では、測定で得られた画像の中心から半径約 1 cm の円で囲まれる範囲の平均値を用いた。葉の先端部では、画像中の葉の面積に応じて対象範囲の円を小さくした。葉の主脈部分で  $Y(\text{II})$  が低い傾向等見られたが、今回は面的なばらつきを無視し、範囲内の平均値を用いた。データの解析では、 $F_m$ -factor (1.361) を用いて測

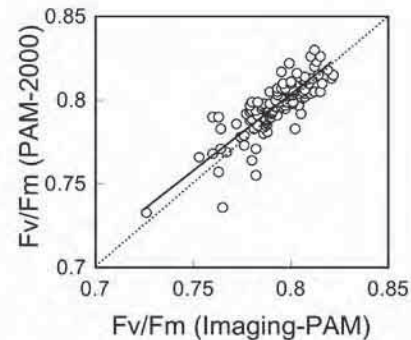


図-2 Imaging-PAM と PAM-2000 で測定した  $F_v/F_m$  の比較。点線は正比例の関係を示す。実線が両者の回帰式を表す:  $[\text{PAM-2000}] = 0.87 [\text{Imaging-PAM}] + 0.11$ ,  $R^2 = 0.677$ ,  $n = 111$

定機器依存の測定値の補正を行った。 $F_m$ -factor の値は、付属のプラスチック製蛍光標準シートを 12 段階の光強度下で測定したときの  $F_v/F_m'$  の平均値とした。

土壌乾燥処理解除後の光合成活性: 乾燥処理終了の 1 週間後にセンサス葉の光合成活性を上記と同様の方法で再度測定した。また、乾燥処理開始後に発達した葉 (若齢葉) についても同様の測定を行った。

葉の水ポテンシャル: 土壌乾燥の指標として、夜明け前の葉の水ポテンシャルをプレッシャーチャンバー (Model-3000, Soil Moisture Equipment Co., Santa Barbara, CA) を用いて測定した。測定葉には前夜からラップとアルミホイルを被せた。土壌の体積含水率 (TDR) も測定した (Hydrosense; Campbell Scientific Australia Pty. Ltd.) (データは示していない)。

統計解析: dry 個体の結果について、一元配置分散分析で各測定日ごとに両  $\text{CO}_2$  処理の 370 ppm と 720 ppm で測定した  $F_v/F_m$ ,  $Y(\text{II})$ ,  $Y(\text{NPQ})$ ,  $Y(\text{NO})$  の比較を行った。共分散分析で乾燥処理期間中の灌水前に測定した各生育環境  $\text{CO}_2$  (通常  $\text{CO}_2$  が 370 ppm, 高  $\text{CO}_2$  が 720 ppm) での値 ( $F_v/F_m$ ,  $Y(\text{II})$ ,  $Y(\text{NPQ})$ ,  $Y(\text{NO})$ ) の  $\text{CO}_2$  処理間比較を行った。共変量に乾燥開始後の日数を用いた解析と、葉の水ポテンシャルを用いた解析を行った。

## 結果

Imaging-PAM の  $F_v/F_m$  は PAM-2000 の  $F_v/F_m$  と高い相関を示し、正比例関係からのずれも小さかった (図-2)。

夜明け前の葉の水ポテンシャルは乾燥開始後 1 週で -1 MPa まで低下し、4 週間には -1.4 MPa まで低下した (図-3 a)。週 1 回の灌水の翌朝には乾燥開始前の値まで上昇した。高  $\text{CO}_2$  下の葉の水ポテンシャルは通常  $\text{CO}_2$  に比べて高い傾向を示した。

乾燥処理期間中、 $\text{CO}_2$  処理に関わらずセンサス葉の  $F_v/F_m$  に顕著な低下は見られなかった (図-3 b)。程度は少ないが、乾燥処理 30 日までは処理日数と共に  $F_v/F_m$  が低下する傾向を示した。この傾向は葉の水ポテンシャルに対しても同様に見られ、高  $\text{CO}_2$  の dry 個体のほうが通常  $\text{CO}_2$  の dry 個体よりも  $F_v/F_m$  がわずかに低い傾向を示した ( $P < 0.01$ ) (図-4 a)。葉の先端部の  $F_v/F_m$  は中央部より低い傾向を示した ( $P < 0.01$ )。

乾燥処理開始前, 同じ CO<sub>2</sub> で測定した Y(II)は高 CO<sub>2</sub> で低下し, Y(NPQ)は高 CO<sub>2</sub> で上昇する傾向を示した (P<0.05)。その結果各生育環境の CO<sub>2</sub> で測定した Y(II)と N(NPQ)は CO<sub>2</sub> 処理間で差がなかった (図-3 cd)。

生育環境の CO<sub>2</sub> で測定した Y(II)は乾燥処理期間中低下した (P<0.05)。週1回の灌水後に上昇したが, 乾燥処理前の値までは回復しなかった。葉の水ポテンシャルの低下に伴い Y(II)が低下した (P<0.05) が, CO<sub>2</sub> 処理間の差はなかった (図-4 b)。

生育環境 CO<sub>2</sub> で測定した Y(NPQ)は乾燥処理期間中上昇し, 4週間後には乾燥処理前の約5倍まで上昇した(図-3 d)。葉の水ポテンシャルの低下に伴い Y(NPQ)が大幅に上昇した (図-4 c)。CO<sub>2</sub> 処理間の差はなかった。

生育環境 CO<sub>2</sub> で測定した Y(NO)は乾燥処理の3週間後に CO<sub>2</sub> 処理間差を示した (図-3 e)。乾燥処理期間中低下傾向を示したが変化幅は小さかった (図-4 d)。

乾燥処理終了後1週間でセンサス葉の Y(II)と Y(NPQ)が大幅に回復した。ただし, 処理開始前より Y(II)が低く, Y(NPQ)が高かった。

乾燥処理開始後に発達した若齢葉は, センサス葉の乾燥解除から1週間後の値に比べて Y(II)が高く, Y(NPQ)が低かった (図-3 cd)。

考察

今回の実験の乾燥処理では, シラカンバの成熟葉が枯死・脱落することなく, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> に顕著な低下を示さなかったため (図-3 b), 土壤乾燥により光合成機能に傷害となるストレスを受けなかったことが明らかになった。この乾燥処理に対する反応には, CO<sub>2</sub> 処理間で差が見られなかったことから, 今回のシラカンバの結果では, 高 CO<sub>2</sub> 環境下の湿潤条件下で成熟した葉は, 乾燥によるストレスを受けやすい」という仮説は支持されなかった。

土壤乾燥に伴い成熟葉の Y(II)が低下し (図-3 c, 4 b), Y(NPQ)が上昇した (図-3 d, 4 c)。この結果から土壤乾燥に伴う Y(II)の低下で示される光合成活性の低下に対して, Y(NPQ)の上昇で示される制御された光防衛的な熱エネルギーの放散を増大させることにより対処していたことが明らかになった。その結果, 制御できないストレスを受けることなく Y(NO)の値が上昇しなかった (図-3 e, 4 d) と考えられる。この反応は CO<sub>2</sub> 処理に関わらず同様であり, 高 CO<sub>2</sub> 下でもシラカンバは, 葉の水ポテンシャルが-1.5MPa 程度までの土壤の乾燥に対して光合成機能に障害を受けることなく対処できることが明らかになった。

時系列では成熟葉の Y(NO)に CO<sub>2</sub> 処理間差が見られた (図-3 e) が, 葉の水ポテンシャルの低下に対する Y(NO)の変化に CO<sub>2</sub> 処理間で差がなかったことから (図-4 d), 高 CO<sub>2</sub> のほうが土壤の乾燥が進んでいなかったこと (図-3 a) が影響していると考えられる。

今回の実験では, 乾燥処理を開始する前に, 同じ CO<sub>2</sub> で測定した Y(II)が高 CO<sub>2</sub> 下で低下し, それぞれの生育環境の CO<sub>2</sub> 濃度で測定した Y(II)に CO<sub>2</sub> 処理間で差がなかったことから (図-3 c), 光合成活性にダウンレギュレーションが生じていたことが示唆された。

乾燥処理解除後のセンサス葉の光合成活性 (Y(II))

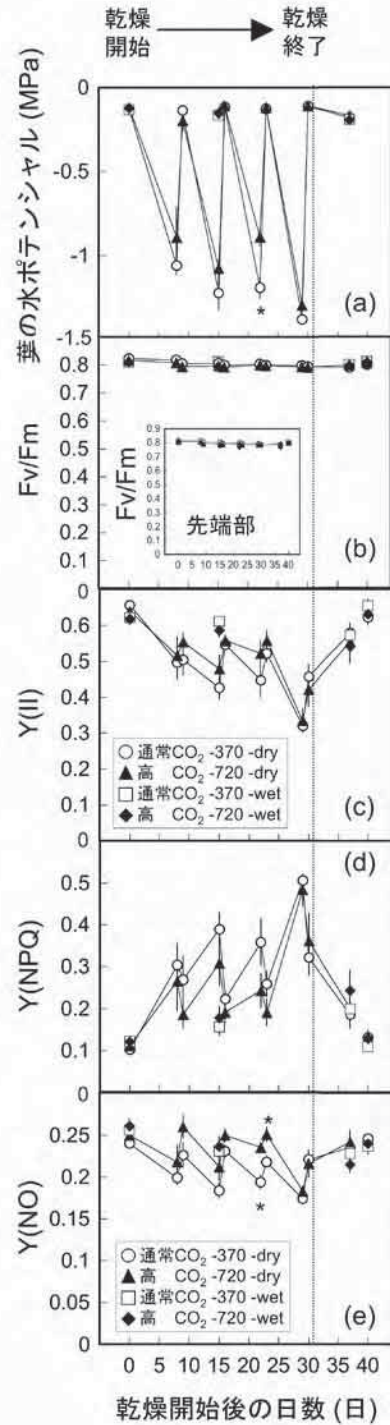


図-3 乾燥処理開始後の乾燥個体 (dry) センサス葉の水ポテンシャル (a) とクロロフィル蛍光のパラメータ, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> (b), Y(II) (c), Y(NPQ) (d), Y(NO) (e) の変化。生育環境の CO<sub>2</sub> 濃度で測定した値を示す。40日目に乾燥後に発達した葉 (若齢葉) の値を示す。0日, 15日, 37日, 40日にはコントロールの湿潤個体 (wet) の値も示した。図3b内に挿入した小グラフは, 葉先端部の F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> の変化を示す。\*は, 処理間で統計的に有意差があることを示す (P<0.05)。通常, 720 ppm CO<sub>2</sub> で測定した値は, 370 ppm CO<sub>2</sub> で測定した値に比べて Y(II)と Y(NO)では上昇し, Y(NPQ)では低下する

が、乾燥処理4週後の灌水翌日の値に比べて上昇したことから(図-3c)、土壌水分条件の改善により光合成活性が回復することが明らかになった。乾燥処理開始前の値に比べてY(II)が低下したが、wet 個体のセンサス葉と差がなかったことから、加齢の影響が考えられる。

dry 個体の若齢葉の光合成活性がセンサス葉の乾燥解除後の値に比べて上昇した(図-4c)が、wet 個体の若齢葉の光合成活性と差がなかったことから、乾燥下で生育した葉の光合成活性が湿潤条件に比べて上昇するという乾燥に対する順化反応(7,10)は、1ヶ月間の乾燥処理では確認できなかった。

F<sub>m</sub>-factor による補正を行った Imaging-PAM の F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> 値は、PAM-2000 の測定値と比べて妥当であることが確認できた(図-2)。今回の結果から Imaging-PAM を光合成活性の評価に利用できる可能性が示された。今後、測定した画像データから光合成活性の平面的なばらつきを評価する。

ただし、未解決の問題点も残されている。今回葉の上面を覆わずに測定したため、ガス交換のデータを取ることができなかった。自然光用のチャンバーを利用した LI-6400 との同時測定の方法を改良する必要がある。また Imaging-PAM での測定に 300 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 程度の光強度を用いたが、より強光下での測定が必要である。強光下で妥当なパラメータの値を得るために、今後も F<sub>m</sub>-factor の値の検討が必要と考える。

引用文献

(1) Ainsworth E.A. and Rogers A. (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO<sub>2</sub>]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment* **30**: 258-270.

(2) Aldea M. *et al.* (2006) A method for quantitative analysis of variable physiological processes across leaf surface. *Photosynth. Res.* **90**: 161-172.

(3) Geßler A. *et al.* (2007) Potential risks for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a changing climate. *Trees* **21**:1-11.

(4) Hendrickson L. *et al.* (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* **82**: 73-81.

(5) Houghton J.T. *et al.* (2001) *Climate Change 2001*. Cambridge Univ. Press, New York.

(6) 北尾光俊 (1996) 酸性降下物が北海道の落葉広葉樹の成長に与える影響—マンガン過剰害を中心に—. *生物科学* **48**: 4-9.

(7) Kitao M. *et al.* (2007) Interaction of drought and elevated CO<sub>2</sub> on photosynthetic down-regulation and susceptibility to photoinhibition in Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) seedlings grown under limited N availability. *Tree Physiol.* **27**(5):727-735.

(8) Klughammer C. and Schreiber U. (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* **1**: 27-35.

(9) Kramer D.M. *et al.* (2004) New fluorescence parameters

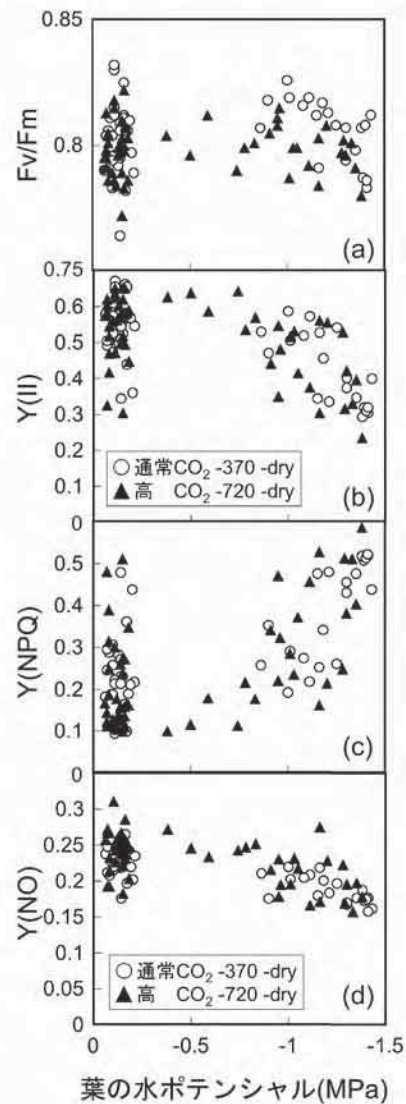


図-4 乾燥処理個体 (dry) の葉の水ポテンシャルとクロロフィル蛍光のパラメータ、F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> (a), Y(II) (b), Y(NPQ) (c), Y(NO) (d) との関係。生育環境の CO<sub>2</sub> 濃度 (通常 CO<sub>2</sub> が 370 ppm, 高 CO<sub>2</sub> が 720 ppm) で測定した値を示す。通常, 720 ppm CO<sub>2</sub> で測定した値は、370 ppm CO<sub>2</sub> で測定した値に比べて Y(II) と Y(NO) では上昇し、Y(NPQ) では低下する

for the determination of Q<sub>A</sub> redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.* **79**: 209-218.

(10) Tobita H. *et al.* Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub>, phosphorus deficiency, and soil drought on nodulation and nitrogenase activity in *Alnus hirsuta* and *Alnus maximowiczii*. *Symbiosis* (doi: 10.1007/s13199-009-0037-7).

(11) 上村 章ら (2009) ハンノキ属 2 種の水分特性に対する高 CO<sub>2</sub> 濃度の影響. *日林北支論* **57**: 195-197.

(12) Watanabe Y. *et al.* (2008) Effects of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen on wood structure related to water transport in seedlings of two deciduous broad-leaved tree species. *Trees* **22**(4): 403-411.