

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05718

研究課題名(和文) 摂氏0 前後から開始するシラカンバの脱馴化初期プロセスの解明

研究課題名(英文) Investigation of early stages of deacclimation process of boreal trees

研究代表者

春日 純 (Kasuga, Jun)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：40451421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、冬から春にかけての気温の上昇に伴って樹木の組織で見られる細胞の耐寒性の低下機構について、シラカンバおよびブドウを材料として調べた。ソルビトール溶液で脱水ストレスを与えたシラカンバの木部柔細胞の温度上昇への応答を調べたところ、凍結環境で起こる脱水ストレスは耐寒性低下につながる温度感知に関与しないことを示唆する結果が得られた。また、ブドウの冬芽は過冷却をすることで凍結温度に適応し、厳冬期の冬芽は氷点下数度から耐寒性の低下が起こることを明らかにするとともに、耐寒性の低下に道管形成が関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、地球規模の気候変動が世界的な問題となっており、冬から春にかけての気温が上昇することで、樹木が越冬のために十分な耐寒性を獲得することができず、凍霜害の頻度が増加することが懸念されている。本研究では、この時期に起こり得る樹木の細胞の温度応答を示したが、これは、温暖化の進行に伴う樹木の凍霜害のリスク予測につながる。また、耐寒性の低下機構の解明は、冬から春にかけての凍霜害を受けにくい樹木の育種に向けた指標の設定につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of seasonal deacclimation of boreal trees induced by the increase of ambient temperature in early spring. The result of an experiment in which the responses of Japanese white birch xylem parenchyma cells to temperature shifts under dehydration stresses were investigated suggested that the dehydration stress under subfreezing temperatures did not involve in the temperature sensing mechanism leading to deacclimation in birch xylem parenchyma. In experiments using grape dormant buds, we suggested that cells in grape buds adapted to subfreezing temperatures by supercooling and that the cells initiated deacclimation at high subfreezing temperatures, e.g. -2°C. we also suggested a possible involvement of vessel formation in the decrease of cold hardiness during deacclimation process in grape buds.

研究分野：植物生理学

キーワード：北方樹木 脱馴化 過冷却 木部柔細胞 冬芽

1. 研究開始当初の背景

植物の凍霜害は、低温馴化により植物が高い耐寒性を持つ厳冬期よりも、脱馴化により耐寒性の低下が始まる早春期に起こることが多い。現在、地球温暖化が世界的な問題となっているが、温帯以北の地域では冬期の気温の上昇によって一時的な脱馴化や脱馴化の早期化が起こり、冬から春にかけて凍霜害が拡大することが懸念されており、近年、北方地域の樹木についても脱馴化過程に関する研究が増加している。これらの中には野外で生育する樹木を用いた研究もあるが、温度や光などの特定の環境要因に注目する場合には、人工気象器を用いてポット苗や枝などを脱馴化させる。しかし、これまでの人工気象器による脱馴化処理のほとんどは 15°C以上の温度で行われており、冬から早春に野外で樹木が経験する温度環境とは大きく異なっている。

研究代表者は、人工気象器を用いて厳冬期に採取したシラカンバの枝に含まれる樹皮と木部の細胞が脱馴化を開始する温度を調べ、樹皮では 4°Cに 4 週間、木部では 0°Cに 3 日間もしくは -2°Cに 7 日間置くことで細胞の耐寒性が低下する様子を観察した (Takeuchi and Kasuga 2018)。また、-5°Cでは両組織で 4 週間以内に耐寒性の変化は見られなかった。これらの実験では植物組織を一定温度で処理しており、野外の温度環境とは異なるが、野外の樹木でも氷点下数度から徐々に脱馴化が進行することを十分に示唆している。「脱馴化による耐寒性の変化はどのように開始するのか」、また、「冬期の一時的な脱馴化や脱馴化の早期化はどのように起こるのか」、これらの疑問を解決するためには、Takeuchi and Kasuga (2018) で見られたような低温で起こる脱馴化の初期過程を理解する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、シラカンバをはじめとする北方樹木を材料として用いて冬期に採取した枝を氷点下数度から摂氏数度で処理し、樹皮および木部において脱馴化の初期過程で起こる生理的な変化を明らかにすることを目的とした。Takeuchi and Kasuga (2018) では、厳冬期のシラカンバの木部柔細胞の耐寒性が -2°Cでの脱馴化処理で低下することを確認したが、植物細胞が氷点下温度で脱馴化するという報告はこれまでに無く、この温度帯での脱馴化の初期過程の研究は全く新しい試みである。

3. 研究の方法

- (1) これまでに植物の持つ温度認識機構として、光受容体であるフィトクロムやフォトトロピンの関与が報告されている。これらの光受容体による温度認識には、光活性化された光受容体が不活性化する速度が関与すると考えられている。しかしながら、多くの植物細胞で脱馴化は暗黒下でも進行するため、この脱馴化過程には光受容体が関与しない温度認識機構が使われていると考えられる。Kasuga et al. (2007) は、厳冬期のシラカンバの木部柔細胞の細胞内融点は -4°C程度であることを示した。この温度は同細胞で脱馴化が開始する温度帯と一致する。このことは、脱馴化が観察されない -5°Cでは木部柔細胞のプロトプラストに若干の脱水ストレスがかかっており、脱馴化が起こる -2°Cでは十分に復水し、脱水ストレスはかかっていないことを示す。そこで、木部柔細胞ではこの脱水ストレスの有無が間接的に脱馴化開始温度の感知に関与している可能性があると考え、ソルビトールによる脱水ストレスをかけた木部柔細胞による温度に対する応答を調べることで、脱水ストレスと温度感知の関連性を調べた。この実験では、厳冬期に採取したシラカンバの木部組織の樹液を 1.08 M と 2.69 M のソルビトール溶液で置換し、0°Cもしくは 4°Cに 1 週間置いた後に電解質漏出法により木部組織に含まれる細胞の耐寒性を評価した。
- (2) Pagter and Williams (2011) は、温帯性の樹木では枝に比べて冬芽で脱馴化が早く起こるという報告をした。そこで、木部柔細胞に加えて、樹木の冬芽の脱馴化過程についても調べることとした。冬芽の脱馴化について調べるにあたっては、シラカンバに比べて冬芽が大きいために実験材料としての扱いが容易であり、他の樹木に比べてこれまでに耐寒性に関する知見が集積されているブドウを用いることにした。まず、ブドウの冬芽の凍結挙動を低温走査型電子顕微鏡によって確認するとともに、ブドウの冬芽で脱馴化が開始する温度の特定を試みた。脱馴化開始温度の特定のためには、厳冬期に採取したブドウの冬芽を -5、-2、0、4、10、もしくは 20°Cに設定した人工気象器に入れ、1、3、および 7 日後の耐寒性を示差熱分析で評価した。また、秋から春にかけて屋外で生育するブドウの冬芽の耐寒性変化を調べるとともに、ポリエステル不織布や農業用ポリオレフィンなど様々なシート資材で被覆することで樹体の温度を外気よりも高くしたブドウについても、冬芽の耐寒性を調べた。人工気象器による処理で耐寒性の低下が見られた温度条件での脱馴化処理については、脱馴化をした冬芽の内部構造を光学顕微鏡によって観察した。

4. 研究成果

- (1) 実験前には、シラカンバの木部柔細胞で脱馴化が起こらない -5°Cと同程度の脱水ストレス

をもたらす 2.69 M ソルビトール処理を行った組織では脱馴化が進行せず、樹液を水や 1.08 M ソルビトール溶液で置換した組織に比べて細胞の耐寒性の低下は起こり難いと予想した。しかし、実際には、より高濃度のソルビトール溶液で処理した細胞の耐寒性が 0°C および 4°C で共により大きく低下するという結果が得られた (図 1)。この結果から、木部柔細胞が脱馴化を開始するための温度の感知に脱水ストレスの有無は関係しないことが予想された。しかし、凍結試験前に組織を超純水でリンスしているため、ソルビトール処理を行っていないものよりも処理を行ったもので耐寒性がより低下した理由は今のところ分からない。この理由を明らかにするためには、今後さらに検討を進める必要がある。

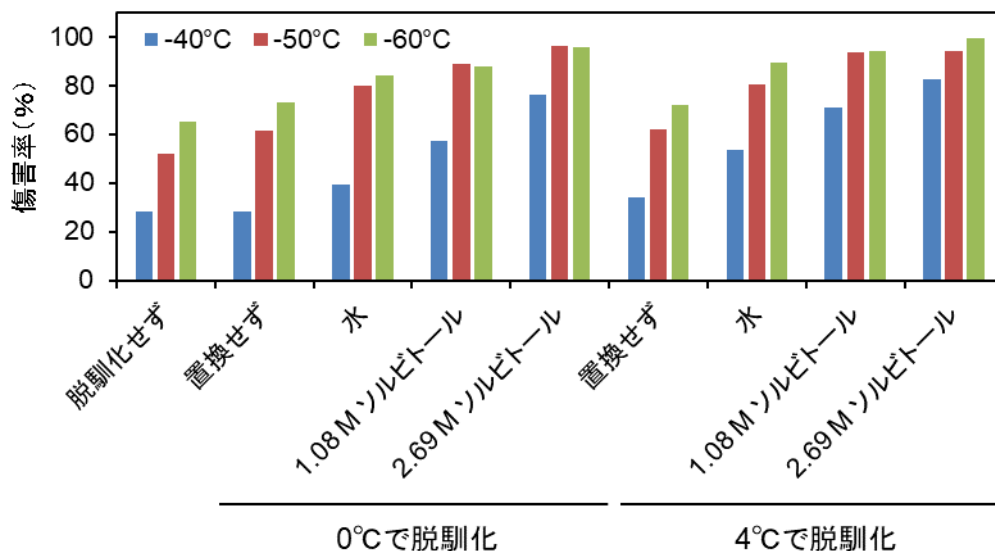


図 1. 樹液を置換したシラカンバの木部組織の脱馴化処理による耐寒性の変化. より高濃度のソルビトール溶液で置換した木部組織で傷害が発生しやすい結果が得られた.

- (2) 低温走査型電子顕微鏡によって厳冬期に採取したブドウの冬芽の凍結挙動を観察したところ、十勝で醸造用に栽培されているブドウの冬芽は、部分的に脱水を受けながら組織内の水分を過冷却させる器官外凍結と呼ばれる凍結挙動を示すことが明らかになった (Kasuga et al. 2020)。人工気象器を用いたブドウの冬芽の脱馴化開始温度の特定では、過冷却によって凍結に応答する木部柔細胞と同様に -2°C から耐寒性の低下が見られ、処理温度が高くなるにつれて脱馴化速度は上昇した (図 2)。屋外環境における耐寒性の変化は‘清見’という品種を用いて調べたが、被覆処理を行わなかった植物体では厳冬期までに重度の傷害が発生し、脱馴化過程における耐寒性の変化を調べることができなかった (Tsumura et al. 2019)。一方、シート状資材で被覆した‘清見’では、傷害発生は見られたものの、秋から春にかけて耐寒性の評価を行うことができた (論文投稿中)。Ferguson et al. (2014) が示したブドウの耐寒性予測モデルでは、低い温度から脱馴化が始まるブドウの品種であっても日平均気温が 3°C を超えてから脱馴化が起こるとされているが、我々の試験では、‘清見’の冬芽では日平均気温が 0°C を超えない時期から耐寒性の低下が見られた。

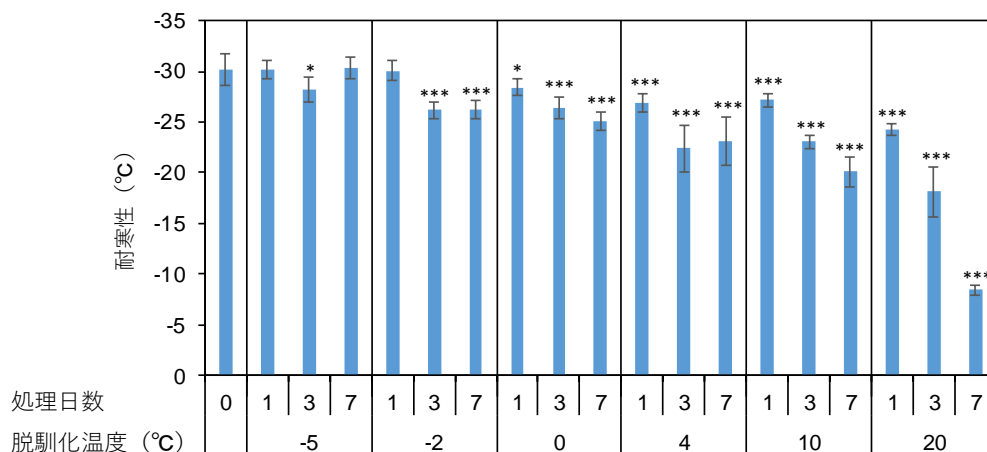


図 2. ブドウ育種系統 A の冬芽の人為的な脱馴化処理による耐寒性変化. -2°C よりも高い温度での脱馴化処理で、1 週間の間に明瞭に耐寒性の低下が見られた.

- (3) ブドウの冬芽の内部は過冷却により凍結適応するが、氷点下温度では幹や枝に含まれるほとんどの水分は凍結するため、冬芽が過冷却を続けるためには、その基部の組織が枝から冬芽内部葉の凍結の伝播を防ぐバリアとして機能する必要がある。人工気象器による人為的な脱馴化処理を行ったところ、20℃でこのバリア機能が低下することを示唆する結果を得た。そこで、20℃で7日間人為的な脱馴化処理を行った冬芽の基部の組織を偏光顕微鏡によって観察したところ、当該組織内の維管束において、厳冬期の冬芽に比べて二次壁を持つ道管の数が有意に増加することを確認した。この結果から、脱馴化過程における道管の発達が、バリア組織の機能低下をもたらすことが示唆された。今後、摂氏0度前後の低温で見られる脱馴化にも道管の発達が関与する可能性があるのか、より低い温度で脱馴化処理を行った冬芽の基部の観察を行っていく。

<引用文献>

- Ferguson JC, Moyer MM, Mills LJ, Hoogenboom G, Keller M (2014)** Modeling dormant bud cold hardiness and budbreak in twenty-three *Vitis* genotypes reveals variation by region of origin. 65: 59-71
- Kasuga J, Arakawa K, Fujikawa S (2007)** High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells. *New Phytologist* 174: 569-579
- Kasuga J, Tsumura Y, Kondoh D, Jitsuyama Y, Horiuchi R, Arakawa K (2020)** Cryo-scanning electron microscopy reveals that supercooling of overwintering buds of freezing-resistant interspecific hybrid grape 'Yamasachi' is accompanied by partial dehydration. *Journal of Plant Physiology* 253: 153248.
- Pagter M, Williams M (2011)** Frost dehardening and rehardening of *Hydrangea macrophylla* stems and buds. *HortScience* 46: 1121-1126
- Takeuchi M, Kasuga J (2018) Bark cells and xylem cells in Japanese white birch twigs initiate deacclimation at different temperatures. *Cryobiology* 80: 96-100
- Tsumura Y, Azuma H, Takahashi Y, Atucha A, Hirano N, Kasuga J (2019)** Cold hardiness of wine grape variety 'Kiyomi' during dormant season in Tokachi area. *Cryobiology and Cryotechnology* 65: 75-79.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Tsumura Yusuke, Atucha Amaya, Azuma Hakaru, Takahashi Yu, Hirano Natsuki, Kasuga Jun | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Cold hardiness of wine grape variety 'Kiyomi' during dormant season in Tokachi area | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cryobiology and Cryotechnology | 6. 最初と最後の頁 75 ~ 79 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20585/cryobolcryotechnol.65.2_75 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 春日純 | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 北方樹木の寒冷環境適応機構の解明 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 低温生物工学会誌 | 6. 最初と最後の頁 印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kasuga Jun, Tsumura Yusuke, Kondoh Daisuke, Jitsuyama Yukata, Horiuchi Reiko, Arakawa Keita | 4. 巻 253 |
| 2. 論文標題 Cryo-scanning electron microscopy reveals that supercooling of overwintering buds of freezing-resistant interspecific hybrid grape 'Yamasachi' is accompanied by partial dehydration | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Plant Physiology | 6. 最初と最後の頁 153248 ~ 153248 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jplph.2020.153248 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 津村祐輔、平野夏輝、東億、高橋悠、Amaya Atucha、春日純 |
| 2. 発表標題 醸造用ブドウ品種「清見」における凍害発生機構 |
| 3. 学会等名 第64回低温生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kasuga Jun、Takeuchi Maya |
| 2. 発表標題 Early processes of deacclimation in boreal hardwood species |
| 3. 学会等名 11th International Plant Cold Hardiness Seminar (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------|
| 1. 発表者名 春日純 |
| 2. 発表標題 北方樹木の寒冷環境適応機構の解明 |
| 3. 学会等名 第63回低温生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Arakawa Keita、Kasuga Jun、Takata Naoki | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 Springer | 5. 総ページ数 409 (129-147) |
| 3. 書名 Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications, Iwaya-Inoue M, Sakurai M, Uemura M eds. | |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Fujikawa Seizo、Kuwabara Chikako、Kasuga Jun、Arakawa Keita | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 Springer | 5. 総ページ数 409 (289-320) |
| 3. 書名 Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications, Iwaya-Inoue M, Sakurai M, Uemura M eds. | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

帯広畜産大学植物生理学研究室ホームページ
<http://univ.obihiro.ac.jp/~plantphysiol/index.html>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|