

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19228

研究課題名(和文) 樹木肥大成長期間の検証：年輪は1年のうちに完成しているのか？

研究課題名(英文) Explore the radial growth period of trees: Do tree ring formation complete annually?

研究代表者

安江 恒 (Yasue, Koh)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：00324236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：多様な環境に生育している多樹種を対象に「年輪の形成は1年のうちに終了しているのか」を検証した。

顕微鏡組織学的観察の結果、ハイマツのあて材部、ヒノキの仮道管において、形成層活動終了後または翌年の春になっても生存している仮道管を確認した。但し、これらではS3層の堆積が確認されたため、翌年になっても細胞壁肥厚を行っているのかは不明である。形成層活動開始前の<sup>13</sup>C<sup>18</sup>O<sub>2</sub>パルスラベリングにより、ヒノキ、スギ、シラカシにおいては前年年輪最外部において当年春の同化物の利用が確認された。Nano-SIMSによる観察の結果、ヒノキにおいては年輪境界をまたぐ放射柔細胞の壁肥厚に<sup>13</sup>Cが利用されたことが確認出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

少なくとも、樹種によっては前年年輪にまたがって存在する放射柔細胞の壁肥厚に当年形成層活動開始前の光合成産物が使われていることが確認された。樹木成長に対する気候変動の影響評価や気候復元を行う上で重要な手法である年輪年代学的研究に対して「炭素・酸素同位体比、年輪内最大密度を指標とする研究においては、形成層活動終了後の気候情報が年輪に含まれることを考慮する必要がある」ことを提言する。

研究成果の概要(英文)：We examined "Is the formation of annual rings completed within a year?" using various tree species growing in various environments.

As a result of microscopic observation of developing xylems, the survival of several tracheids of *Pinus pumila* and *Cryptomeria japonica* after the cessation of cambium activity or overwinter. Although, deposition of cell walls in spring was not confirmed since the existence of S3 layer. As a result of <sup>13</sup>C<sup>18</sup>O<sub>2</sub> pulse labeling before the start of cambium activity, the use of photosynthetic products in the spring of current year existed in the outermost part of the annual ring of the previous year in *Chamaecyparis obtusa*, *C. japonica* and *Quercus myrsinifolia*. As a result of observation with Nano-SIMS for *C. obtusa*, <sup>13</sup>C was used for wall thickening of ray parenchyma that cross the annual ring boundary.

研究分野：年輪年代学

キーワード：年輪 形成層 フェノロジー 肥大成長 ラベリング <sup>13</sup>C

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

樹木の肥大成長の結果として毎年1層ずつ形成される年輪は、生育時に受けた環境の影響を記録している。従って、樹木の肥大成長履歴と気候変動の関係を統計的に解析することで、環境変動下での樹木の肥大成長の気候応答を明らかにすることが出来る。さらに、年輪情報を用いて過去の気候復元を行うことも可能である。これまでの年輪年代学的研究は、当然のように年輪に当年以前の影響が記録されている前提で実施されてきた。一方、我々の研究において安定炭素同位体 ( $^{13}\text{C}$ ) によって標識された  $\text{CO}_2$  (以下、 $^{13}\text{CO}_2$ ) を一時的に供給し、ヒノキに光合成によって取り込ませた(以下、 $^{13}\text{CO}_2$  パルスラベリング)ところ、成長開始前の4月にラベリングを行い、秋に伐採した場合に  $^{13}\text{C}$  の局在が前年の年輪の最終部にも確認された(安江ら 2017)。さらに、同部位について脱リグニン処理を行っても  $^{13}\text{C}$  が認められた。このことは、前年年輪の木部細胞が生きて越冬し、翌年に春の光合成産物を用いてセルロース合成を行い、細胞壁を形成したことを示す。これは「年輪」の常識を覆す結果であり、樹木年輪年代学や木質科学の分野に及ぼす影響は大きい。

### 2. 研究の目的

これまで、年輪の形成は成長年のうちに終了すると考えられており、明確な休眠が認められない熱帯や亜熱帯を除いて、年をまたいで年輪が形成されているとの報告は無い。この現象が通常に起こりうるかすれば、「年輪」の常識を覆す結果であり、樹木年輪年代学や木質科学の分野に及ぼす影響は大きい。そこで、本研究では、多様な環境に生育している多樹種を対象に「年輪の形成は1年のうちに終了しているのか」の検証を目的とする。年輪形成過程の顕微鏡組織学的観察および  $^{13}\text{CO}_2$  パルスラベリングによる前年年輪への同化物利用の有無の確認を実施し、年輪形成が1年のうちに終了しているかを検証する。これにより樹木年輪年代学や木質科学分野の新たな研究展開に資する。

### 3. 研究の方法

高山帯から亜熱帯に至る幅広い環境傾度に生育し、組織構造が異なる6樹種を供試木とした(表)。

表：供試木と試料採取地

樹種	落葉・常緑	木材組織構造	植生帯	標高(m)	演習林名
ハイマツ	常緑	針葉樹	高山帯	2400	信州大西駒演習林
オオシラビン	常緑	針葉樹	亜高山帯	2400	信州大西駒演習林
ヒノキ	常緑	針葉樹	夏緑広葉樹林帯	1100	信州大手良沢山演習林
スギ	常緑	針葉樹	夏緑広葉樹林帯	800	信州大構内演習林
シラカシ	常緑	広葉樹放射孔材	常緑広葉樹林帯	50	東京農工大構内
ネズミモチ	常緑	広葉樹散孔材	常緑広葉樹林帯	50	東京農工大FM多摩丘陵
スギ	常緑	針葉樹	亜熱帯	70	琉球大与那フィールド

#### 1) 年輪形成過程の顕微鏡組織学的観察

休眠導入期(9-12月)および成長開始期(3-5月)について、2週間おきに木部および形成層帯を含むブロッ

クを樹幹より採取した。グルタルアルデヒド溶液にて固定後、エポキシ樹脂包埋し、ロータリーミクロトームにて約  $6\mu\text{m}$  厚の木口面切片を得た。染色、永久プレパラートに封入後、光学顕微鏡にて観察を行った。特に生活細胞であることを示す原形質の存在に着目し、越冬中の木部細胞の観察を行った。同時に偏光下において細胞壁最内層である S3 層を複屈折の有無により確認した。

#### 2) $^{13}\text{CO}_2$ パルスラベリングによる前年年輪への同化物利用の有無の確認

形成層活動開始前(3月または4月)にラベリングを実施した。ラベリング時には、樹冠をビニール製チャンバー( $4\times 1\times 1\text{m}$  (H×W×D))にて覆い、99.9% $^{13}\text{CO}_2$  を約1~2L 注入し、光合成により取り込ませた(図1)。供試木はそのまま生育させ、秋(休眠後)に伐採し、形成年および形成前年の年輪を対象に、放射方向に約  $25\mu\text{m}$  厚の板目面連続切片をロータリーミクロトームを用いて切削した。マイクロ天秤にて秤量し、スズカプセルにて梱包し、質量分析計にて炭素同位体比を測定した。前年にラベリング由来の  $^{13}\text{C}$  が確認された資料の一部について、木口面切片を作成し細胞の種類ごとの  $^{13}\text{C}$  の局在を nano-SIMS によって観測した。

以上により、年輪最外部の休眠期を挟む季節変化に伴う木部細胞の分化過程を把握すると共に、翌年の光合成によって生産された産物の木部分化への利用の有無を確認した。



図1：オオシラビンにおける  $^{13}\text{CO}_2$  ラベリング

#### 4. 研究成果

##### 1) 年輪形成過程の顕微鏡組織学的観察

< 亜高山帯, 高山帯針葉樹 (オオシラビソ, ハイマツ) >

西駒演習林森林限界付近において, 2019年6月~10月にかけて打ち抜き試料の観察およびナイフマーキング試料の観察を行った。オオシラビソにおいては5月30日、分裂活動が確認され、9月7日に停止が観察された。6月26日から7月21日の間は分裂活動が活発で、7月21日には肥大成長を9割終えていた。ハイマツにおいては、形成層の分裂活動が6月13日に確認され、9月7日に停止が観察された。分裂活動が確認される前は雪に埋もれていたため、分裂の正確な開始は把握出来ていない。

形成層活動停止後の10月9日において、オオシラビソおよびハイマツの正常材部の当年年輪では全ての仮道管に原形質は認められなかった。一方、ハイマツのあて材部ではデンプン粒が認められる仮道管が散在していた(図2)。これらの仮道管ではS3層が認められた。つまり、生存したまま越冬する仮道管が存在する可能性が高いことが示唆される。

< 温帯性針葉樹 (ヒノキ, スギ) >

信州大学構内演習林におけるスギ, ヒノキについて, 2018年2月~6月の打ち抜き包埋試料の観察により, 休眠期から活動期にかけて年輪形成過程と前年年輪における仮道管および放射柔細胞の観察を行った。ヒノキについて, 休眠期(3月)から形成層活動再開後(5月)までの前年年輪木口面切片を観察したところ, 前年年輪最外部付近に位置する仮道管の一部に内容物が認められた。これらの仮道管の全てでS3層が観察された。さらに柾目面切片において, 明らかに原形質が存在して生存している仮道管と残渣状に原形質が残留している仮道管が確認出来た(図3)。したがって, 少なくとも一部の仮道管は翌年の形成層活動が開始した後も生存していることが確認された。一方, 全ての仮道管においてS3層が確認されたため, 少なくとも壁肥厚の最終段階近くまで達していることが示唆される。S3層の堆積を越冬後も継続しているかどうかは不明である。

スギにおいては, 晩材最外部付近の仮道管の内こうが非常に小さく, 原形質の有無を確認することはできなかった。3月において全ての仮道管でS3層の堆積が確認出来た。

放射柔細胞については, ヒノキ, スギ共に3月から5月の期間中において内容物が認められると共に, S1層, S3層の堆積は認められなかった。したがって, 少なくとも5月までに前年年輪の放射柔細胞の細胞壁肥厚が完了していないことが確認された。

< 常緑広葉樹 (シラカシ, ネズミモチ) >

2019年3月~11月にかけて, シラカシおよびネズミモチを対象に打ち抜き試料の採取およびナイフマーキングを行った。

< 亜熱帯に生育する温帯生針葉樹 (スギ) >

与那フィールドにおいて, 2020年3月~2021年3月にわたり, 打ち抜き試料の採取とナイフマーキングを行った。打ち抜き試料においては, 形成層細胞の分裂の確認, 内容物の確認を行った。その結果, 3月中旬~下旬に新たな形成層細胞の分裂が認められ, 11月には分裂の停止が認められた。前年年輪の仮道管における原形質は確認されなかった。一方, ナイフマーキングにおいては冬期間においても継続的に傷害に対して周辺部での新たな細胞の分裂が認められた。上記の結果は, 形成層細胞は細胞分裂能力を有しながらも細胞分裂を自発的に停止して冬を越していることを示唆している。

##### 2) $^{13}\text{C}_2$ パルスラベリングによる光合成産物の配分解析

< 亜高山帯針葉樹 (オオシラビソ, ハイマツ) >

5月, 6月, 7月にラベリングを実施, 前年および当年年輪への光合成産物の配分を確認した。前年年輪への配分は認められなかった。当年については, 早い月には当年葉への配分割合が大きく, その後当年木部への配分が大きくなる傾向が認められた。また, ハイマツにおいては7月より6月の光合成産物のあて材への配分が大きいことが示された。

< 温帯性針葉樹 (ヒノキ, スギ) >

ヒノキにおいて, 4/6, 4/12にラベリングを行った個体では前年年輪最外部において光合成された $^{13}\text{C}$ が確認されたが, 4/15以降のラベリングでは $^{13}\text{C}$ は確認されなかった(図4)。スギにおいて, 4/14, 4/18のラベリングにおいて光合成された $^{13}\text{C}$ が前年年輪最外部において確認された

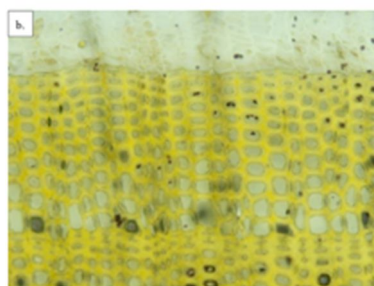
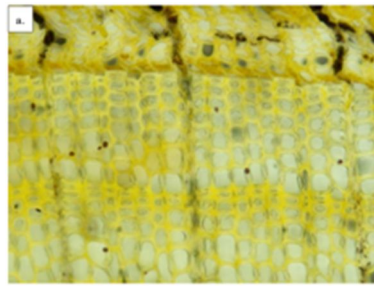


図2: ハイマツ当年年輪のヨウ素反応 (2019.10.9採取) 上: 正常材, 下: あて材

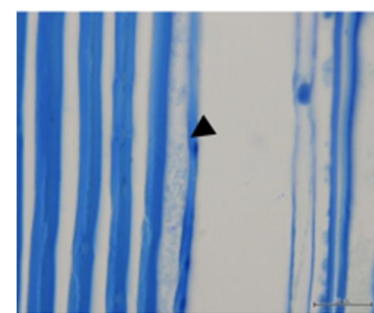


図3: ヒノキの前年年輪(2018年)最外部の仮道管内に認められる原形質(矢頭)。柾目面, 2019.5.20採取

が、5/15 以降のラベリングでは<sup>13</sup>C は確認されなかった。また、これらは脱リグニンを行っても確認された。これらの結果から、形成層開始以前のある時点までの光合成産物が前年年輪最外部に位置する木部細胞の細胞壁肥厚に用いられていることが明らかになった。

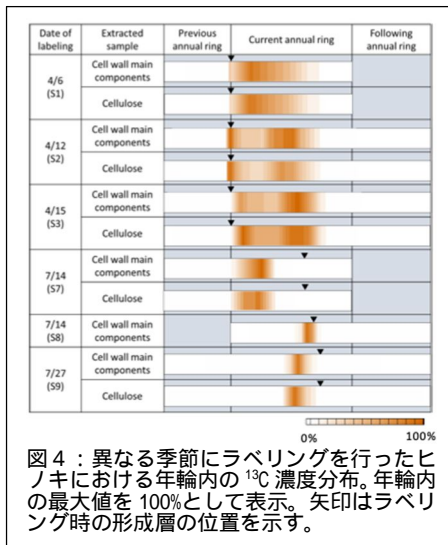


図4：異なる季節にラベリングを行ったヒノキにおける年輪内の<sup>13</sup>C濃度分布。年輪内の最大値を100%として表示。矢印はラベリング時の形成層の位置を示す。

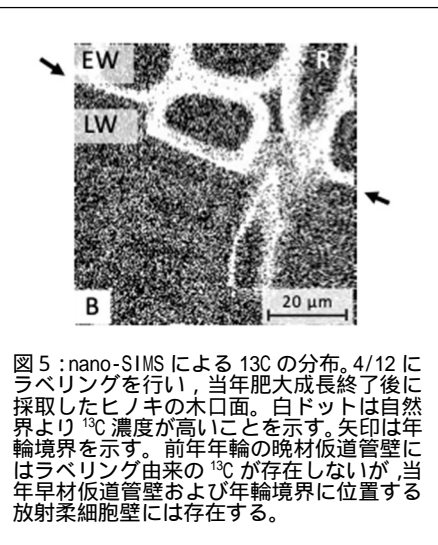


図5：nano-SIMSによる<sup>13</sup>Cの分布。4/12にラベリングを行い、当年肥大成長終了後に採取したヒノキの木口面。白ドットは自然界より<sup>13</sup>C濃度が高いことを示す。矢印は年輪境界を示す。前年年輪の晩材仮道管壁にはラベリング由来の<sup>13</sup>Cが存在しないが、当年早材仮道管壁および年輪境界に位置する放射柔細胞壁には存在する。

### 前年年輪最外

部において春の光合成産物が検出された試料について、<sup>13</sup>Cの局在をnano-SIMSを用いて観察したところ、年輪境界をまたいで配置する放射柔細胞壁に明瞭な<sup>13</sup>Cの局在が観察された(図5)。したがって、前年年輪における当年光合成産物の配分は形成層活動再開前に行われる放射柔細胞の細胞壁肥厚に起因することが確認された。

### <常緑広葉樹(シラカシ、ネズミモチ)>

シラカシにおいて、形成層活動前(2019.3.27)にラベリングした<sup>13</sup>Cが前年年輪の最外部において検出された(図6)。放射柔細胞等への局在については不明である。

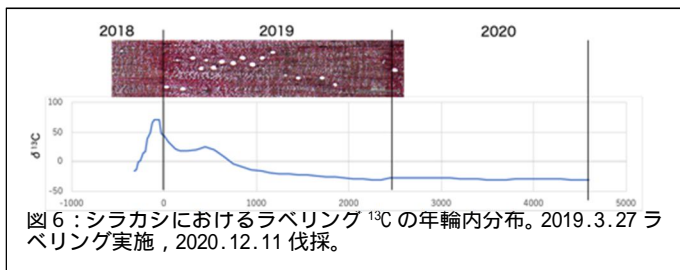


図6：シラカシにおけるラベリング<sup>13</sup>Cの年輪内分布。2019.3.27ラベリング実施、2020.12.11伐採。

### 3) 結論

「年輪の形成は1年のうちに終了しているのか」の検証を目的とし、

多様な環境に生育している多樹種を対象に年輪形成過程の顕微鏡組織学的観察と<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>パルスラベリングによる前年年輪への同化物利用の有無の確認を行った。

年輪形成過程の顕微鏡組織学的観察の結果、ハイマツのあて材部、ヒノキの仮道管において、形成層活動終了後または翌年の春になっても原形質を有し生存している仮道管を確認した。但し、これらの仮道管ではS3層の堆積が確認されたため、翌年になっても細胞壁肥厚を行っているのか、単に生存しているだけなのかは不明である。放射柔細胞の壁肥厚については、形成開始期には認められず、仮道管より遅れて壁肥厚が行われることが確認された。

亜熱帯に植栽されたスギの形成層活動について、活動期～休眠期～活動期の経過を観察したところ、形成層の分裂の休止は認められたが、ナイフマーキング刺激に伴う細胞分裂の開始は冬季を通して観測された。従って、形成層細胞は潜在的な分裂能力を有しながら自発的に分裂活動を停止し、翌春に何らかの要因により分裂活動を再開することが示唆される。分化中木部については、冬を挟んだ分化の一次停止と再開は確認出来なかった。

形成層活動開始前の<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>パルスラベリングの結果、ヒノキ、スギ、シラカシにおいては前年年輪最外部においてラベリングに由来する<sup>13</sup>Cの利用が確認された。Nano-SIMSによる観察の結果、ヒノキにおいては年輪境界をまたぐ放射柔細胞の壁肥厚に<sup>13</sup>Cが利用された事に起因することが確認出来た。

以上の研究結果から、「年輪の形成は1年のうちに終了しているのか」との問いに対する答えは、部分的に「Yes」である。少なくとも、樹種によっては前年年輪にまたがって存在する放射柔細胞の壁肥厚に当年形成層活動開始前の光合成産物が使われていることが確認された。仮道管については冬を越して生存している場合が確認されたが、細胞壁肥厚が翌年に行われている証拠は得られなかった。本研究結果から、今後の年輪年代学的研究に対して以下の注意点が提言される；1)炭素や酸素同位体比を指標とする研究においては、形成層活動終了後の気候情報が年輪に含まれることを考慮する必要がある、2)年輪内密度値を指標とする場合にも、柔細胞壁には形成層活動終了後の気候情報が年輪に含まれる事を考慮する必要がある。3)年輪幅を指標とする場合には、亜熱帯、熱帯を除き翌年の影響は無視してよい。2)について、仮道管壁や木繊維壁について細胞壁肥厚が完了していない可能性が現時点では排除しきれないことから、nano-SIMSの適用などにより今後の検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中曽根詢子, 小林 元, 牧田直樹, 安江 恒
2. 発表標題 森林限界に生育する常緑針葉樹種における光合成産物配分の季節性
3. 学会等名 2019年度樹木年輪研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪野 紫穂, 庄司 岳, 香川 聡, 檀浦 正子, 小林 元, 平野 優, 齋藤 智寛, 安江 恒
2. 発表標題 ヒノキ樹幹における前年年輪形成への光合成生産物利用の可能性
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒川 泉, 香川 聡, 大橋 伸太, 安江 恒, 船田 良, 半 智史
2. 発表標題 13C02標識法を用いたスギ柔細胞におけるデンプン粒として貯蔵された光合成同化産物の分布の解析
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 健吾, 平野 優, 高嶋 敦史, 安江 恒
2. 発表標題 亜熱帯地域に生育するスギの肥大成長の季節変動
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪野 紫穂, 庄司 岳, 香川 聡, 檀浦 正子, 牧田 直樹, 小林 元, 平野 優, 齋藤 智寛, 安江 恒
2. 発表標題 ヒノキ・スギ樹幹における年輪形成への光合成生産物利用の季節変動
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	半 智史  (Nakaba Satoshi)  (40627709)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授   (12605)	
研究分担者	高嶋 敦史  (Takashima Atsushi)  (40433099)	琉球大学・農学部・助教   (18001)	

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
---------	---------