

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25712017

研究課題名(和文) 北方林の植物の窒素獲得戦略：冬季における窒素同化とそのエネルギー源に関する研究

研究課題名(英文) Nitrogen acquisition strategy of boreal forest plants: Winter nitrogen assimilation and its energy source

研究代表者

小山 里奈 (Koyama, Lina)

京都大学・情報学研究科・准教授

研究者番号：50378832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：北方林の植物は冬季における窒素獲得によって不足する窒素の需要に対応していると考え、冬季の植物の硝酸態窒素利用および光合成に関する野外調査と人工気象器実験を行った。米国アラスカ州内陸部で優占するクロトウヒを対象とした調査により、クロトウヒは冬季期間中を通して硝酸態窒素同化を行っていること、それに対して光合成能力は冬季の初期から中期にかけて低下するが、冬季の後期に気温が上昇しても回復は遅れることが示された。また、アカエゾマツを用いた人工気象器実験でも同様に、温度の低下とともに光合成能力が低下するのに対して、温度を上昇させた時の反応は遅れる様子が見られた。

研究成果の概要(英文)：Nitrate use and photosynthesis of boreal tree species were investigated throughout winter to demonstrate that boreal tree species can acquire N in winter to meet the N demand. Field investigations on black spruce (*Picea mariana*) in interior Alaska, USA showed that black spruce was able to assimilate nitrate throughout the winter, while the capacity of photosynthesis declined with decreasing temperature in early to mid-winter, but did not increase when the temperature recovered in the late winter. Sakhalin spruce (*Picea glehnii*) grown in a low temperature incubator showed the same trend. Photosynthetic capacity of Sakhalin spruce declined with decreasing temperature, but did not increase with the temperature rise simulating late winter.

研究分野：植物生理生態学

キーワード：北方林 植物栄養代謝 冬季 窒素同化 光合成

1. 研究開始当初の背景

北方林とは、アラスカ・シベリアなどの高緯度地帯に分布する針葉樹を主とした森林を指す。その総面積は約 1300 万 km<sup>2</sup> におよび、地球上の森林面積の約 1/3 を占めるとされる。昨今、地球規模の環境変動と森林の炭素収支との相互作用に注目が集まっており、北方林は炭素吸収源としての可能性の観点からも重要視されている。

しかし、気温や地温の低さと低温期の長さにより、北方林の環境は本質的に植物の成長にとって非常に厳しく、環境変動の影響を強く受ける生態系であると言える。現状では、このような条件下で北方林が森林として維持されてきた機構について、未解明の点が多い。

未解明点の一つとして、北方林の窒素収支がどのように成立しているのかという点が挙げられる。北方林では、その気温や地温の低さと低温期の長さ起因して、植物が利用可能な土壌中の無機態窒素の生成が温帯に比較して小さく、土壌の窒素可給性が低いとされている。実際に、Lissuzo ら(2008)による北方林生態系における植物の窒素要求量と土壌の窒素供給量の推定では、遷移のほとんどの段階において要求量に対して供給が不足していることが示された (Lissuzo et al. 2008 *Ecoscience* 15: 366-376)。つまり、北方林においては窒素が植物の成長の制限要因として特に重要であると言える。

一方で Lissuzo ら(2008)の結果は、従来有効な窒素供給源と考えられてきた生育期間中の土壌の窒素無機化・窒素固定・降雨降塵による加入以外に、植物に窒素を供給する経路が存在し、植物がそこから窒素を得ていることを示している。この未知の経路を明らかにし、植物の窒素獲得に関する戦略を解明することは、北方林の維持機構を理解する上で必要不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、非常に厳しい環境下で成立している北方林の維持機構について、植物の窒素養分利用の観点から解明することを目指した。これまでに、先行研究により北方林の窒素収支において冬季の寄与が無視できないことが示されており (Kielland et al. 2006 *Biogeochem* 81: 349-360)、冬季に土壌中に生成された無機態窒素を植物が利用できれば、

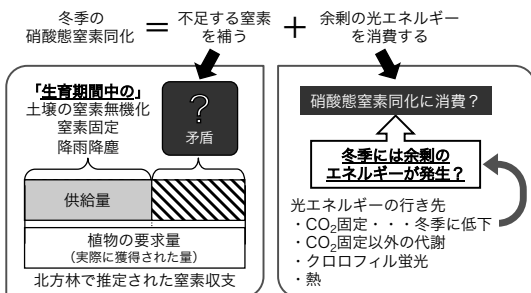


図 1. 研究の枠組。

窒素収支における矛盾の解消につながる (図 1)。そこで本研究では、これまで軽視されてきた冬季に着目して、北方林を構成する植物の窒素利用とそれに係るエネルギーの獲得可能性について明らかにすることを目指した。そしてその結果から、先行研究によって示されてきた窒素収支に関する矛盾点を説明し、非生育期間とされてきた冬季が北方林の植物の生育に果たす役割の評価を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、北方林の植物による窒素獲得戦略の一つとして冬季における窒素獲得があるという仮説を立てた。そして、この仮説を立証するために、窒素利用およびそれにかかるエネルギーを獲得するための光合成に関する (1) 野外調査および (2) 人工気象器実験を行った。

この際、窒素利用に関しては、植物の主要窒素源の一つである土壌中の硝酸態窒素に着目した調査を行った。従来、北方林の土壌中では植物の利用可能な窒素のうち硝酸態窒素が占める比率は小さく、硝酸態窒素が植物の窒素源として果たす役割も小さいと考えられてきた。しかし、研究代表者らはこれまでの調査で北方林の植物にも硝酸態窒素を利用する能力を持つものがあることを示してきた (Koyama & Kielland 2011 *Plant Soil* 342: 129-139)。さらに、先行研究による冬季における土壌中の可給性窒素の生成に関する結果から (Kielland et al. 2006 *Biogeochem* 81: 349-360)、冬季に植物が硝酸態窒素を利用していることが示されれば、窒素収支における矛盾点の解消に対する寄与が大きいと考えたためである。

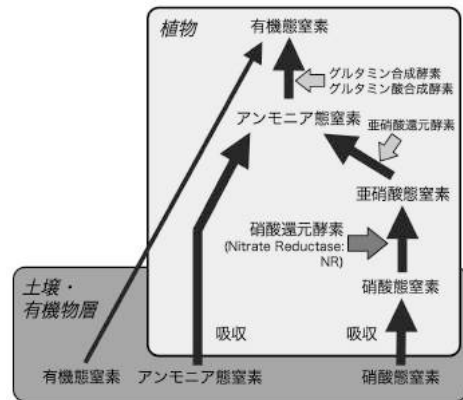


図 2. 植物の窒素吸収と同化の過程

植物は、硝酸態窒素を吸収後に硝酸還元酵素などの働きによる還元の過程を経なければ、同化して利用することができない (図 2)。また、この硝酸還元酵素は基質誘導性で利用可能な硝酸態窒素の影響を受けること、硝酸態窒素の同化には多大なエネルギーが必要とされ、光条件の影響を受けることなどの性質が知られている。このことを利用して、植物の硝酸還元酵素活性 (Nitrate Reductase

Activity: NRA) を測定することにより、土壌の窒素養分条件を改変することなく植物の硝酸態窒素利用について調査することができる。また、植物体中で硝酸態窒素が生産されることは通常ないため、植物体内に硝酸態窒素が検出されれば、植物がそれまでに硝酸態窒素を吸収したことを意味する。このことから植物による硝酸態窒素の吸収と蓄積の指標として植物体内の硝酸態窒素濃度の測定も行った。

### (1) 野外調査

野外調査は、米国アラスカ州のほぼ中央に位置するフェアバンクス市のアラスカ大学フェアバンクス校周辺 (図 3; N64°50'17"、W147°43'35") で行った。調査期間中の気温は最高が約 33°C、最低が約-39°Cであり、平均気温は約 0.5°Cであった (図 4)。平均年降水量は約 500mm であり、そのうち約 35%が降雪であった。また、積雪期間は 10 月中旬から 4 月下旬までであった。調査地の森林において、極相を構成するとされる針葉樹クロトウヒ (*Picea mariana*) の成木を対象とした。

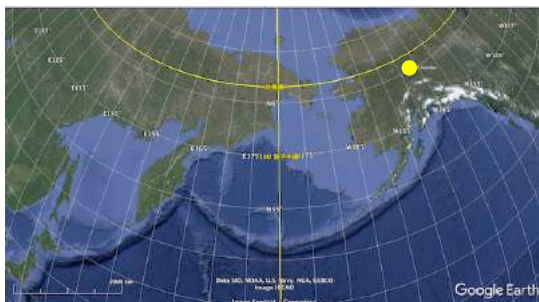


図 3. 野外調査地の位置。

### ① 窒素利用

窒素利用に関する主な調査項目は、当年葉および細根の NRA と硝酸態窒素濃度の季節的变化と、夏季および冬季における NRA の培養温度に対する反応である。

NRA 等の季節的变化に関しては、2014 年度から 2016 年度までの研究期間中、冬季の初期から後期までの様々な段階において計 8 回の調査を行い、比較対照として夏季にも同様の調査を行った。

NRA の培養温度に対する反応について、イネ科草本 *Deschampsia flexuosa* を対象とした先行研究では、測定時の酵素の培養温度に依存して変化し、0°C ではほとんど検出されず、30°C 前後で最も高くなることが示されている (Högberg et al. 1992 *Scand J For Res* 7: 1-14)。本研究でも同様に、-5~30°C まで測定時の培養温度を変化させた時のクロトウヒ針葉および細根の NRA を測定した。培養温度に対する反応については、冬季の初期・中期・後期の 3 回と比較対照としての夏季に調査を実施した。

### ② 光合成

クロトウヒの光合成に関する生理特性を

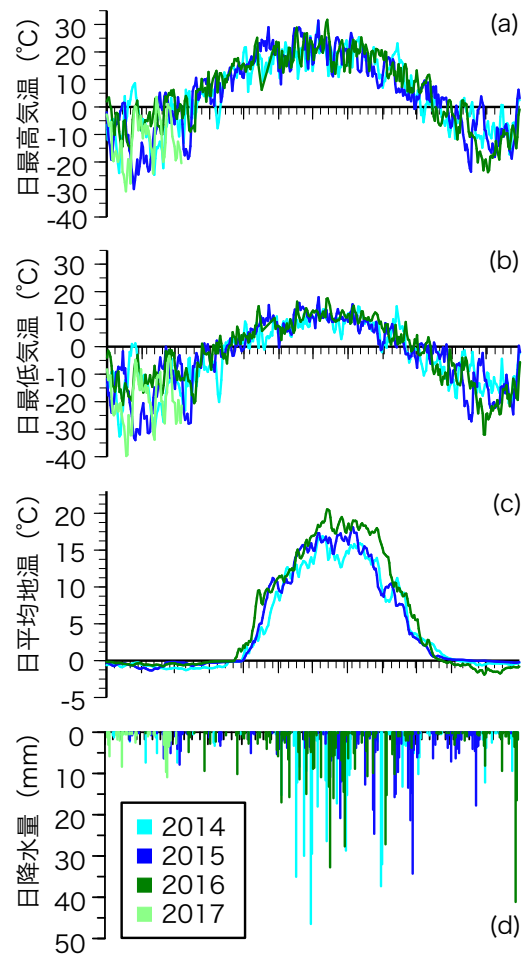


図 4. 調査期間中の野外調査地の気象条件 (a)日最高気温、(b)日最低気温、(c)日平均地温、(d)日降水量の変化を示す。データは全て、調査地から最寄りの米国長期生態研究サイト Bonanza Creek 試験林で測定されたものである。

把握するため、光合成速度の光に対する反応の季節変化を調査した。当初、計画に含めていた冬季の野外における光合成速度の測定は測器が野外条件下では使用できないことが明らかになったため、切り枝を用いてインキュベータ内で光条件に対する光合成の反応を測定した。冬季期間中の変動を明らかにするため、調査は 2014 年 11 月から 2015 年 3 月までの期間中、週に 2~3 回程度の頻度で行った。また、比較対照として、夏季にも野外条件下における光合成とその光に対する反応を調査した。測定には光合成測定装置 LI-6400XT (Li-Cor 社製) を用いた。

また、光-光合成曲線から得られた最大光合成速度、暗呼吸速度などを応答変数とし、サンプル採取日の気象条件 (気温、地温、土壌含水率、積雪深、光合成有効放射、日照時間) を説明変数とした動的線形モデルを作成した。赤池情報量規準 (Akaike Information Criterion: AIC) を基準としたモデル選択を行い、最適な説明変数の組み合わせを求めた。



## (2) 人工気象器実験

人工気象器実験は京都大学（京都市左京区；N35°01'34"、E135°46'51"）で行った。人工気象器内でアカエゾマツ (*Picea glehnii*) 実生苗を育苗し、気温の変化に対して光合成の光に対する反応がどのように変化するか調査した。

あらかじめ 3°C で育苗したアカエゾマツ苗木を入れた人工気象器の温度を -5°C、-10°C、-15°C、-10°C、-5°C、1°C の段階に順次変化させ、各温度段階で 5 日以上馴化させた後、光合成速度を調査した。ただし、測定に用いた LI-6400XT の測定可能温度を考慮し、測定の 24 時間前に 1°C の環境に対象個体を移動させて測定を実施した。この際に、段階的に変化させた光条件に対する光合成速度の反応を測定して光-光合成曲線を得た。さらに、光合成速度測定後、暗条件で馴致した後、クロロフィル蛍光 (Fv/Fm) を測定して光阻害の程度を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) 野外調査

#### ① 窒素利用

調査地に分布するクロトウヒからは、針葉と細根のいずれにおいても硝酸態窒素が検出された (図 5)。冬季と夏季ともに針葉で硝酸態窒素濃度が細根よりも高かった。ただし、冬季のほうが、針葉と細根の差が大きくなり、細根の硝酸態窒素濃度が低くなっている様子が見られた。植物は通常、植物体内で硝酸態窒素を生成することはなく、植物体内に検出された硝酸態窒素は、植物が吸収し、まだ同化されていないもの、あるいは蓄積しているものと考えられる。つまり、従来硝酸態窒素が窒素源としては重視されてこなかった北方林において、クロトウヒが土壌から硝酸態窒素を吸収していたことが明らかにされた。本研究でクロトウヒ組織内から検出された硝酸態窒素の濃度はかなり低いものであり、タデ科などに見られる硝酸態窒素を蓄積するタイプの種とは全く異なる。しかし、季節により濃度が変化しており、その傾向が針葉と細根で異なることから、窒素が硝酸態の形態で転流されており、蓄積されている器官と同化される器官が異なる可能性が示され

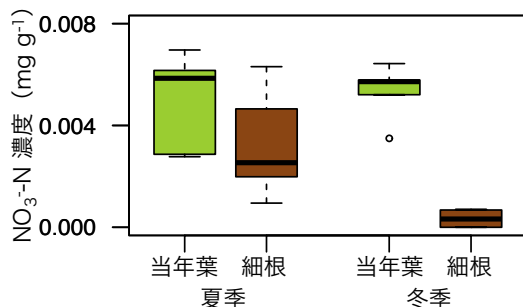


図 5. 夏季および冬季におけるクロトウヒ当年葉と細根中の硝酸態窒素濃度

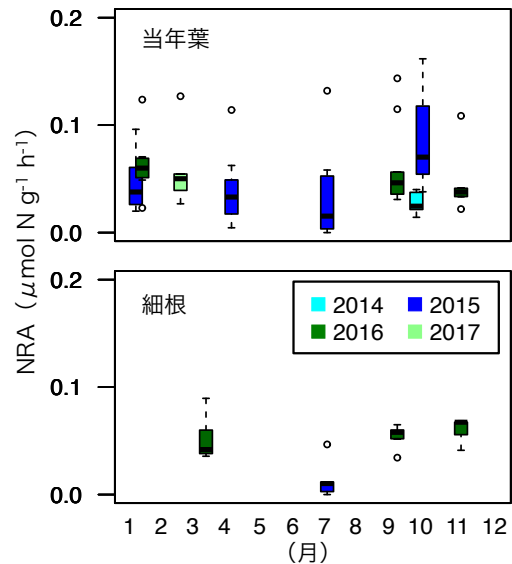


図 6. 野外調査地におけるクロトウヒの硝酸還元酵素活性の季節変化

た。

NRA は年間を通じて針葉と細根の両方で検出された (図 6)。冬季と夏季で NRA に顕著な差は認められず、冬季の初期・中期・後期を比較しても大きな差は見られなかった。また、冬季の初期に NRA の日による変化の幅を把握するために、7 日間連続の NRA 測定を行った。その結果、測定日間で NRA に大きな差は認められず、NRA が日照など日によって大きく異なる環境要因による影響をあまり受けていないことが示唆された。このことから、NRA に顕著な季節変化が見られなかった原因が測定したタイミングにあるという可能性は低いと考えられる。また、測定時の気温は -25°C ~ +25°C までの幅があったが、この気温と NRA の間には有意な相関は認められなかった。

先行研究では、イネ科草本 *D. flexuosa* の NRA は測定時の酵素の培養温度に依存して変化を示し、30°C 前後で最高となった (Högberg et al. 1992 *Scand J For Res* 7: 1-14)。それに対して、本研究で対象としたクロトウヒは、培養温度を変化させても、NRA に変化は見られなかった。これは、針葉と細根、冬季と夏季のいずれにおいても共通した傾向であった。

#### ② 光合成

1°C に設定したインキュベータ内で切り枝をサンプルとしてクロトウヒ当年葉の光-光合成曲線を得た (図 7)。最大光合成速度は、冬季の初期から中期にかけてやや低くなる傾向を示したのに対し、暗呼吸速度は冬季を通じて変動が大きく、季節に伴う顕著な変化を示さなかった。

最大光合成速度を応答変数とした動的線形モデルにおいて、最もあてはまりのよかった説明変数の組み合わせは 50cm 高の気温と 20cm 深および 100cm 深の地温であった。標

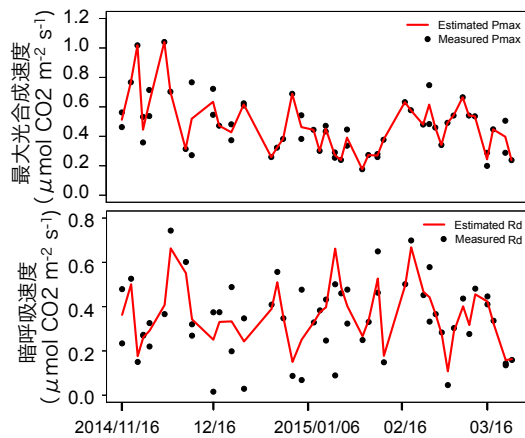


図 7. 野外調査地におけるクロトウヒ成木の光-光合成曲線から得られた最大光合成速度と暗呼吸速度の季節変化。それぞれ、黒点(●)は実測値、赤線(—)は動的線形モデルから得られた推定値を示す。

準化回帰係数の季節的变化は、冬季の初期には気温の寄与が大きかったのに対し、冬季の後期には気温よりも地温の寄与が高くなる傾向を示した。地温は調査期間中を通じて大きな変化を示さなかったことから、冬季の初期には気温に対応して最大光合成速度が変化していたが、冬季の後期には気温の変化に対応した変化を示さなかったと言える。同様の傾向は、北方林の下層植生を構成する低木を対象とした先行研究でも見られており、最も気温などが低くなる冬季の中期を経験した植物は冬季の初期に示したような生理的反応を示すまでに時間がかかることが推測されている (Saarinen et al. 2011 *Plant Ecol* 212: 1429-1440)。

## (2) 人工気象器実験

人工気象器内で気温を $-5^{\circ}\text{C}$ 、 $-10^{\circ}\text{C}$ 、 $-15^{\circ}\text{C}$ 、 $-10^{\circ}\text{C}$ 、 $-5^{\circ}\text{C}$ 、 $1^{\circ}\text{C}$ の順序で変化させ、それぞれの温度段階で馴化させたアカエゾマツ実生苗の光-光合成曲線を得た。最大光合成速度は気温低下と共に低下したが、気温を上昇させた時にはほとんど上昇せず、気温を $1^{\circ}\text{C}$ まで上昇させた時に多少の回復が見られた。また、クロロフィル蛍光 (Fv/Fm) も同様の傾向を示した。一方、暗呼吸速度など他のパラメータは馴化された温度条件による有意な差は見られなかった。この結果は、野外調査においてクロトウヒから得られた結果と共通した傾向を示しており、低温環境下で受けた阻害からの回復には時間がかかることを示唆している。

総合すると、北方林の極相種の一つであるクロトウヒは、これまで北方林の植物の窒素源としては軽視されてきた土壤中の硝酸態窒素を窒素源として利用していることが明らかにされた。また、硝酸態窒素の同化は季節を通じて起こっており、きわめて厳しい環境である冬季にも硝酸態窒素同化を司る酵

素の活性が見られた。この硝酸態窒素同化には多大なエネルギーが必要であるとされている。このエネルギー供給源としての光合成に関する調査の結果は、クロトウヒ針葉の光の供給に対する反応性は冬季の初期と後期で異なり、冬季の終わりに光の供給が増えるのと同時に温度が上昇しても、同様の光および温度条件にあった冬季の初期と同程度に光合成を行うことはできないことを示した。このことは、冬季を通じて硝酸態窒素同化に大きな変化が見られないことは対応せず、特に冬季の後期には植物は硝酸態窒素を同化するために必要なエネルギーを別の経路で得ている可能性が示された。

また、近年大きな課題となっている地球温暖化が北方林に及ぼす影響、特に冬季の短期化と高温化の影響といった観点から結果を検討すると、クロトウヒの硝酸態窒素同化に関しては調査時の温度や季節の影響が小さかったことから、直接的な温暖化の影響は小さい可能性が示唆された。それに対し、光合成に関しては同様の光・温度条件が植物に及ぼす影響が冬季の初期と後期では異なることが示された。これまでに積雪の影響を強く受ける低木で示されてきたのと同様の傾向が、極相を構成する高木であるクロトウヒでも観察されたといえる。このような生理的特性に対する環境変動の影響を北方林の動態を含む長期的な視点から評価するためにはさらなる知見と検討が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Makoto Kobayashi, Takuya Kajimoto, Lina Koyama, Gaku Kudo, Hideaki Shibata, Yosuke Yanai, J. H. C. Cornelissen, Winter climate change in plant-soil systems: summary of recent findings and future perspectives. *Ecological Research* 査読有 29(4), 593-606 (DOI: 10.1007/s11284-013-1115-0), 2014

[学会発表] (計 3 件)

- ① Lina A. Koyama and Knut Kielland, Nitrate use by black spruce in winter in boreal forests, 日本生態学会第 64 回全国大会, 2017. 3. 東京
- ② 藤野 匠・小山里奈, 低温環境下におけるアカエゾマツの光合成能力に温度変化が及ぼす影響, 日本生態学会第 63 回全国大会, 2016.3. 仙台
- ③ Takumi Fujino, Lina A. Koyama, Knut

Kielland, Wintertime photosynthetic capacity of black spruce (*Picea mariana*) in boreal forests in interior Alaska. American Geophysical Union Fall Meeting 2015, 2015. 12. San Francisco, California, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山里奈 (Lina A. Koyama)

京都大学・大学院情報学研究科・准教授

研究者番号：50378832