



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	落葉広葉樹の水分通導に関する組織学的研究
Author(s)	内海, 泰弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第4825号
Issue Date	1999-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3151506
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51603
Type	doctoral thesis
File Information	000000336697.pdf



落葉広葉樹の水分通導に関する
組織学的研究

林産学専攻 博士後期課程

内 海 泰 弘

①

目次

落葉広葉樹の水分通導に関する
組織学的研究

第一章 緒言

1.1 研究の動機と目的	1
1.2 研究の範囲と問題点	5
1.3 研究の方法	11
1.4 研究の結果	16
1.5 研究の結論	18
1.6 研究の意義	18
1.7 研究の展望	19
1.8 研究の参考文献	24
1.9 研究の謝辞	24
1.10 研究の発表履歴	24
1.11 研究の論文目録	24
1.12 研究の論文要旨	27
1.13 研究の論文本文	29
1.14 研究の論文参考文献	31

林産学専攻 博士後期課程

内海泰弘

目 次

第 1 章 緒論

1.1 はじめに-----	1
1.2 これまでの研究と問題点-----	5
1.3 本論文の目的-----	11

第 2 章 Cryo-SEM による木部水分分布の観察法

2.1 はじめに-----	15
2.2 実験方法-----	18
2.2.1 供試木-----	18
2.2.2 Cryo-SEM 法-----	19
2.2.3 立木染色法-----	24
2.3 結果-----	24
2.3.1 試料の採取法と作製法-----	24
2.3.2 試料の採取法と水ポテンシャルとの対応-----	27
2.3.3 立木染色試料の観察-----	29
2.4 考察-----	31

第 3 章 ヤチダモの木部水分分布の季節変化と水分通導

3.1 はじめに-----	37
3.2 実験方法-----	39

3.2.1 供試木	39
3.2.2 Cryo-SEM 法の試料採取と観察試料の作製	39
3.2.3 立木染色法による染料注入と試料採取	40
3.2.4 光学顕微鏡法	40
3.2.5 気温データ	40
3.3 結果	41
3.3.1 15 年生ヤチダモの木部水分分布の季節変化	41
3.3.2 3, 4 年生ヤチダモの木部水分分布の季節変化	49
3.3.3 15 年生ヤチダモの染料上昇部位の季節変化	53
3.3.4 15 年生ヤチダモの光学顕微鏡観察	59
3.3.5 気温	61
3.4 考察	64

第4章 シラカンバとオノエヤナギの木部水分分布の季節変化と水分通導

4.1 はじめに	70
4.2 実験方法	72
4.2.1 供試木	72
4.2.2 Cryo-SEM 法の試料採取と観察試料の作製	72
4.2.3 立木染色法による染料注入と試料採取	73
4.2.4 気温および地温のデータ	73

4.3	結果	73
4.3.1	シラカンバとオノエヤナギの枝の木部水分分布の季節変化	74
4.3.2	シラカンバの樹幹の木部水分分布の季節変化	85
4.3.3	シラカンバの樹幹の染料上昇部位の観察	88
4.3.4	気温および地温	92
4.4	考察	92
143		
第5章	凍結・融解処理によるヤチダモの孔圏道管のキャビテーション	
	シヨン	
5.1	はじめに	100
5.2	実験方法	102
5.2.1	供試木	102
5.2.2	凍結・融解処理	102
5.2.3	温室処理	105
5.2.4	凍結・融解処理試料の CLSM 観察	105
5.3	結果	106
5.3.1	凍結・融解処理試料の当年孔圏部の水分分布の変化	106
5.3.2	凍結試料の融解過程での当年孔圏部の水分分布の変化	115
5.3.3	凍結ストレスを回避させた試料の当年孔圏部の水分分布	115
5.3.4	凍結・融解処理試料の CLSM による検討	117
5.4	考察	119

第6章 総合考察と結論

6.1 Cryo-SEMによる木部の水分分布の観察法の検討-----	128
6.2 ヤチダモおよびシラカンバ、オノエヤナギの水分通導-----	133
謝辞-----	142
引用文献-----	143

第1章 緒論

1.1 はじめに

樹木は通水要素により根から吸収した水と無機養分を樹冠の葉まで移動させる。樹種によって樹高はさまざまであるが、センペルセコイア (*Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endlicher ; 注 1) ではその樹高は最大で 120mにも達する (Hora, 1981) 。大きな樹高をもつ樹木は、他の植物と比較して光条件では競合的優位性をもつことになる。しかしながら、樹高の増大は同時に、重力による水ストレスの増加を引き起こす。樹高 100m の樹木の樹冠においては 0.9MPa 以上の張力が通水系にかかっていると試算されている (Steudle, 1995) 。

樹木はこのような水ストレスに耐えながらも、根から吸収した水を樹冠の葉にまで運び蒸散と光合成を行うが、このような重力に抗しての長距離にわたる水の移動メカニズムについての説としてこれまで凝集力説が広く受け入れられている (Dixon and Joly, 1894 ; Dixon, 1914) 。凝集力説は一般に水ポテンシャルを用いて説明される (Slatyer and Taylor, 1960) 。水ポテンシャル (ψ) は、純水の化学ポテンシャル (μ_0) を基準とし、その基準と任意の相あるいは系の水の化学ポテンシャル (μ) との差を水の部分モル容量 (V) で除した値である (増田, 1977 ; 森川と佐藤, 1978) 。

$$\psi = (\mu - \mu_0) / V$$

水の移動は水ポテンシャルの高い相から低い相へ向かって起こる。凝集力説では、樹木の通水系の水が凝集力により根から葉まで連続した水柱になっていることを前提にしている。まず葉の蒸散により葉内の水ポテンシャルが低下すると木部の水ポテンシャルとの間に差が生じ、木部の水が葉に移動する。続いて木部に負圧 (注 2) が生じてそこでの水ポテンシャルが低下する。この低下が次々に下

方へと伝わって根の組織からの水の移動を引き起こし、根の水ポテンシャルが低下する。最終的には土壌の水ポテンシャルと根の水ポテンシャルの間に差が生じて土壌から根への吸水が起こると考えられている。

このように樹木の通水系は蒸散時には負圧になっていると一般には考えられている。しかしながら、いくつかの樹種においては木部に正圧が測定される場合があることが報告されている。つる性木本植物のブドウ属 (*Vitis*) の数種と *Tetracera* 属の数種では木部の圧力が正になることが報告されている (Scholander et al., 1955, 1957; Scholander, 1958; Ewers et al., 1997) 。 Sperry et al. (1987) はラブルスカブドウ (*Vitis labrusca* L.) とリパリアブドウ (*Vitis riparia* Michaux) では開葉前の木部に 10~100kPa の正圧が測定されたと報告している。しかし、すべてのつる性木本植物の木部に正圧が測定されるわけではない (Ewers et al., 1997) 。広葉樹においてはカバノキ属 (*Betula*) やカエデ属 (*Acer*) で開葉前の春期に木部に正圧が記録されたことが報告されている (Merwin and Lyon, 1909; Kramer and Kozlowski, 1960; Sperry, 1993; Sperry et al., 1994; Hacke and Sauter, 1996a) 。しかし、これまでに木本植物で報告されている木部の正圧は、ラブルスカブドウでは最大約 0.4MPa (Scholander et al., 1955) , オクシデントカンバ (*Betula occidentalis* Hook.) では最大約 120kPa (Sperry et al., 1994) などであり、樹種によっては地上高 100m 以上にもなる樹冠にまで水が移動する要因とは考えられておらず、水分通導 (注 3) はおもに蒸散により行われるとされている (Kramer, 1939; Greenidge, 1957a; Kozlowski, 1961) 。

樹木の水分通導の仕組みを説明するために、樹幹の通水系を葉と根を繋いで水を運ぶ管とみなして説明を行ってきたが、樹幹の水分通導の経路は樹種によりさまざまである (Greenidge, 1957b) 。樹木における水分通導の経路は、広葉

樹では道管が、針葉樹では仮道管がおもなものとして考えられている (Zimmermann and Brown, 1971 ; Zimmermann, 1983) . 広葉樹と針葉樹のいずれにおいても、樹幹のすべての通水系で水分通導を行っているわけではない。これまでの研究から、温帯に生育する落葉散孔材樹木（以下散孔材樹木と略記する）や針葉樹では辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲（注 4）の通水系で水分通導が行われており、温帯に生育する落葉環孔材樹木（以下環孔材樹木と略記する）では、当年に形成された孔圏道管（以下当年の孔圏道管または当年孔圏道管と略記する）でおもに水分通導を行っていると考えられている (Greenidge, 1957b ; Kozlowski and Winget, 1963 ; Chaney and Kozlowski, 1977 ; Ellmore and Ewers, 1986) . このことは樹木が枯死する以前に通水系に水分通導機能障害が起きることを意味する。

樹木において通水系に水分通導機能障害が起きることを“エンボリズム”といい、その原因としては“キャビテーション”が考えられている。Milburn (1991) はキャビテーションとは“植物体内の水分（おもに樹液）中での空洞の形成”であるとしているが、本論文では樹木の水分通導に関して論じており、“水で満たされていた通水要素内こうの一部または全部を占有する空隙の形成”をキャビテーションと定義する。

キャビテーションが樹木の通水系に起こる原因として水ストレスと木部の凍結が考えられている (Tyree and Sperry, 1989 ; Sperry, 1993) . 水ストレスによるキャビテーションのメカニズムとしては、過度の水ストレスが水で満たされている通水系に加わると気体で満たされた隣接細胞の内こうから壁孔対を介して通水系に気体が侵入し、この気体が通水系内の張力により拡大してキャビテーションが起きるという仮説が考えられている (Zimmermann, 1983 ; Sperry and Tyree, 1988) . 一方、木部の凍結によるキャビテーションのメカニズムとして

は、通水系内の水に溶解していた気体が、水が凍結する際に気体の水に対する溶解度と氷に対する溶解度の違いにより気泡として氷中に形成され、氷の融解時または融解後に気泡が残存したままの状態に通水系内に張力が働くと、この気泡が拡大してキャビテーションが起きるという仮説が考えられている (Tyree and Sperry, 1989 ; Sperry, 1993) .

樹木におけるキャビテーションはこのように水ストレスと木部の凍結で起きると考えられているが、病原線虫の感染により障害を受けた樹木の木部でもキャビテーションが起きる。例えば、クロマツ (*Pinus thunbergii* Parlatores) やアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) におけるマツノザイセンチュウ病による枯死の直接的な原因は、仮道管にキャビテーションが起きることによるとされている (Ikeda and Suzaki, 1984a ; Kuroda et al., 1988 ; 黒田ら, 1991) . そのメカニズムとしては、マツノザイセンチュウの侵入により放射柔細胞の代謝が異常になり、疎水・揮発性物質が生成されてキャビテーションが誘発され、水分通導機能障害が起きることが考えられている (Kuroda et al., 1988 ; Kuroda, 1990, 1991 ; 黒田, 1990a, b) .

樹木はこのようにキャビテーションによる水分通導機能障害の危険に常にさらされながらも、針葉樹や散孔材樹木では辺材の外層部から内層部の広い範囲の仮道管と道管で、環孔材樹木ではおもに当年の孔圏道管でそれぞれ水分通導を行っていると考えられている。樹木における水分通導のメカニズムに関する研究は樹木生理学のみならず樹木病理学の学問分野においても極めて重要であり、これまでに多くの研究成果が報告されている。

以下に、水分通導に関与している道管や仮道管の年輪内での部位の特定、樹液流速の測定、通水系の水ポテンシャルの測定、キャビテーションと水分通導機能障害の程度の測定、に関するこれまでの研究とその問題点について述べる。

1.2 これまでの研究と問題点

樹木の水分通導に関与している通水系を観察する方法として染料注入法がおもに用いられてきた (Greenidge, 1957b ; Kozlowski and Winget, 1963 ; Chaney and Kozlowski, 1977) . これは開葉時に蒸散により負圧になっている通水系に染料を吸引させ, その染料上昇部位を観察することによって水分通導を行っている通水系を特定する方法である.

Greenidge (1957b) は, バルサミフェラヤマナラシ (*Populus balsamifera* L.), ルテアカンバ (*Betula lutea* Michaux), アメリカアサダ (*Ostrya virginiana* (Mill.) K. Koch), アメリカブナ (*Fagus grandifolia* Ehrhart), ルブラムカエデ (*Acer rubrum* L.), アメリカトネリコ (*Fraxinus americana* L.), アメリカニレ (*Ulmus americana* L.), グラウカトウヒ (*Picea glauca* (Moench) Voss) の立木の木部に染料を注入し (以下立木染色法と略記する), 染料注入部より樹軸方向上部での木部の染色を観察している. その結果, すべての樹種で染料の上昇が見られ, 環孔材樹木で辺材外層部での染料の上昇が観察されたとしている. Kozlowski and Winget (1963) はレジノーサマツ (*Pinus resinosa* Aiton), ストローブマツ (*Pinus strobus* L.), バンクシアナマツ (*Pinus banksiana* Lambert), カナダツガ (*Tsuga canadensis* (L.) Carrière), マクロカルパナラ (*Quercus macrocarpa* Michaux), アルバナラ (*Quercus alba* L.), アメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides* Michaux), グランディデンタータヤマナラシ (*Populus grandidentata* Michaux), パピリフェラカンバ (*Betula papyrifera* Marshall), サトウカエデ (*Acer saccharum* Marshall) を用いて立木染色法による観察を行い, マクロカルパナラとアルバナラではおもに樹皮側より数えて 1, 2 年輪目に染料の上昇がみられ, そのほかの樹種では辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲で染料の上昇が観察されたと報告して

いる。また、アメリカトネリコとサトウカエデの 3 年生の苗木を用いて立木染色法により観察したところ、アメリカトネリコは当年の孔圏道管におもに染料の上昇が観察されたのに対して、サトウカエデでは樹皮側から数えて 1, 2 年輪目の道管に染料の上昇が観察されたことが報告されている (Chaney and Kozlowski, 1977)。

上述のように、環孔材樹木では当年の木部のとくに孔圏道管に染料の上昇が観察され、散孔材樹木や針葉樹では辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲で染料の上昇が観察されることから、環孔材樹木の水分通導はおもに当年の孔圏道管で行われ、針葉樹と散孔材樹木の水分通導は辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲の仮道管と道管でそれぞれ行われると考えられる。しかし、広葉樹の場合この手法では染色される領域が道管だけに限定されない場合があり、たとえば髄伴柔組織や道管に隣接する木部繊維に染色が観察されたときに、これらの柔細胞や木部繊維が水分通導に関与するかどうかを判断することは困難である。

樹木内部の水の移動速度を明らかにするためにもさまざまな研究が行われている。樹液流速度を測定する試みは、染料注入法を用いても行われ、樹液流速度はルテアカンバでは約 1~5m/h、アメリカニレでは約 10~40m/h であると報告されている (Greenidge, 1957b)。そのほかにも、樹幹の辺材に熱線を挿入して樹液に熱を与え、熱線から熱線より上部に設置したセンサーまでの距離と、そのセンサーに熱変化が検出されるまでの時間から樹液流速度を求めるヒートパルス法も多く用いられている (Cohoen et al., 1988; Granier et al., 1994; Zang et al., 1996; Borghetti et al., 1998; Wullschlegel et al., 1998)。しかし、当年の孔圏道管でおもに水分通導を行うと考えられている環孔材樹木では、当年の孔圏部付近と前年以前の通水系では樹液流速度が異なることが考えられる。ペトラエナラ (*Quercus petraea* (Mattuschka) Lieblein) においては熱線とセ

ンサーを辺材に挿入する深さによって樹液流速が変化したという報告もあり (Granier et al., 1994), 正確な樹液流速測定が困難な場合がある。さらに, 熱線やセンサーを設置するためには木部へのせん孔が必要であるが, せん孔部より通水系に空気が侵入してキャビテーションが起き (Crafts, 1939; Zimmermann and Brown, 1971), 樹液流速を正確に測定できない可能性も考えられる。

樹木の通水系内の水ポテンシャルを測定する方法としては, これまでプレッシャーチャンバー法 (Scholander et al., 1965) がおもに用いられている。試料採取時に通水系が負圧になっていた場合に試料の切断面の通水要素の内こうに周囲の空気が引き込まれる。この空気が引き込まれる程度が立木時の試料の通水系に作用していた負圧に対応すると仮定し, プレッシャーチャンバー内で試料を加圧し, 試料切断面まで通水要素内こうの水が戻ってきたときの値をその試料の木部圧ポテンシャルとするものである。この木部圧ポテンシャルは葉の水ポテンシャルと近似する (森川と佐藤, 1976; 森川と丸山, 1987)。プレッシャーチャンバー法は現在まで広く適用されている (森川と佐藤, 1976; 佐藤と森川, 1976; 高橋, 1976; 佐藤, 1977) が, プレッシャーチャンバー法による測定値はプレッシャープローブ法 (木部に圧力を測定する微細なパイプ状の針を挿入して通水系内の圧力を直接的に測定する方法) (Balling and Zimmermann, 1990; Zimmermann et al., 1995a, b; Schneider et al., 1997) による測定値より低いことが報告されている (Zimmermann et al., 1995a, b)。この違いはプレッシャーチャンバー法の測定を行うのに要する時間が正確な測定を行うには不十分であったり, 通水要素内こうに粘性物質が存在する場合があるためではないかと主張している報告もある (Zimmermann et al., 1995c)。

樹木のキャビテーションはおもにアコースティックエミッション (以下 AE と

略記する) 法を用いて研究されている。AE 法は、細胞の内こうに存在している水柱が何らかの原因で途切れるとこれに伴い AE 波が発生することから、試料に取り付けた AE センサーで AE 波を電気信号に変換して検出するというものである (Milburn, 1970, 1973 ; Tyree and Dixon, 1983 ; Tyree et al., 1984a, b, 1986 ; 池田, 1994) 。 AE 法を用いた研究では、供試木に水ストレスを与えた際に AE 波が検出されることから、水ストレスによるキャビテーションを測定できるとしている (Crombie et al., 1985 ; Tyree and Dixon, 1986 ; Milburn, 1991, 1993 ; Jackson et al., 1995 ; Jackson and Grace, 1996) 。 しかし、AE 法では水分通導に関与していない組織の内こうの水柱が途切れたときに発生する AE 波も検出されるという指摘もある (Sperry et al., 1988a ; Jackson and Grace, 1996) 。

水分通導機能障害の程度を定量的に調べる方法としてはおもに木部の透水度 (本論文においては hydraulic conductivity を透水度と表記する) を測定することが行われてきた。木部の透水度を表すために用いられる用語は研究者によりまちまちであり, Peel (1965) は specific conductivity という言葉を用い, Heine (1971) や Ikeda and Suzaki (1984b) は relative conductivity という言葉を用いているが, いずれにせよ採取した試料の両端に圧力差を生じさせて水溶液を試料に透過させ, 経過時間, 流量, 試料横断面積, 試料長をそれぞれ測定し, 木部の透水度 (k) を次式より求めている。

$$k = VL\eta / taP$$

(V : 透過した水溶液の流量, L : 試料長, η : 透過した水溶液の粘度, t : 経過時間, a : 試料横断面積, P : 圧力差)

しかし、透水度の値は同一試料で測定を繰り返すたびに次第に低下することが報告されており (Peel, 1965) , 正確な木部の透水度を測定することには問題

があった。近年になって、Sperry et al. (1988b) は透水性の値が低下するのは道管中に細菌が増殖するためであるとして、シュウ酸水溶液やホルムアルデヒド水溶液などの細菌の増殖をおさえる水溶液を用いることにより厳密な測定が可能であるとしている。さらに、これらの水溶液を通水系内の気体が十分に溶解すると考えられる高い圧力で試料に透過させた後に測定した透水性を最大値とし、木部の透水性をこの最大値に対する割合で示した（以下この手法を透水性法と略記する）。

透水性法は現在まで広く適用されており（Sperry et al., 1987 ; Tyree and Dixon, 1986）, サトウカエデやヨーロッパブナ（*Fagus sylvatica* L.）では冬期に透水性が低下することが報告されている（Sperry et al., 1988c ; Magnani and Borghetti, 1995）。透水性が冬期間に低下することは多くの樹種で報告されているが、低下の程度は針葉樹よりも広葉樹が大きいという報告がある。Sperry (1993) は、コーディフォリアカンバ（*Betula cordifolia* (Reg.) Fern.）, アメリカブナ, バルサムモミ, ルーベンストウヒ（*Picea rubens* Sargent）の透水性の季節変化を調べ、2月上旬から5月上旬にかけての広葉樹の透水性が最大値から60～84%低下していたのに対して、針葉樹の透水性が最大値から15～60%低下したとしている。さらにSperry et al. (1994) は、冬期間にガンベリナラ（*Quercus gambelii* Nutt.）, オクシデントカンバ, バルサミフェラヤマナラシでは透水性が低下したが、ラシオカルパモミ（*Abies lasiocarpa* (Hooker) Nuttall）, ラリシナカラムツ（*Larix laricina* (Duroi) K. Koch）, グラウカトウヒでは広葉樹と比較して透水性の低下が小さかったとしている。広葉樹のなかでもヨーロッパヤチダモ（*Fraxinus excelsior* L.）, ガンベリナラ, ペトラエナラ, プベセンスナラ（*Quercus pubescens* Willd.）, ロブルナラ（*Quercus robur* L.）, バルサミフェラヤマナラシでは、秋期から冬期にかけ

ての気温が零度を最初に下回った後に透水度が著しく低下したことが報告されている (Cochard and Tyree, 1990 ; Cochard et al., 1992 ; Sperry and Sullivan, 1992 ; Sperry et al., 1994 ; Hacke and Sauter 1996a) . また, LoGullo and Salleo (1993) はイレクスナラ (*Quercus ilex* L.) の木部を人工的に凍結させると透水度が低下すると報告している.

樹木に水ストレスを与えた時の木部の水分通導の変化についても透水度を測定することにより研究されており, 広葉樹と針葉樹のどちらにおいても水ストレスを与えると透水度が低下することが報告されている (Tyree and Dixon, 1986 ; Sperry et al., 1988a ; LoGullo and Salleo, 1991 ; Tyree et al., 1992 ; Kolb and Davis, 1994 ; Higgs and Wood, 1995 ; Tyree and Cochard, 1996 ; Hacke and Sauter, 1996b ; Kavanagh and Zaerr, 1997 ; Langan et al., 1997 ; Tsuda and Tyree, 1997) . このように透水度の測定は, 木部の水分通導が季節, 凍結ストレス, 水ストレスによりどのように変化するかを定量的に明らかにすることができる.

これまで述べてきたように, 樹木の水分通導はおもに樹液流速度, 木部圧ポテンシャル, AE 波, 透水度を測定することにより定量的に研究されてきた. これらの研究により樹木の水分通導には日変化や季節変化があり, 木部の凍結や水ストレスによっても水分通導に変化があることが明らかになってきている. さらに, 立木染色法による研究からも, 水分通導に関与する通水系は樹種によってさまざまであり, すべての通水系が水分通導を行うのではなく, 通水系は樹木が枯死する以前に水分通導機能障害を起こす場合があることも明らかになっている.

しかし, 従来の手法で明らかにされた水分通導の変化は, 木部全体での変化を測定したものであり, 個々の通水系が水分通導を行っているのか, それとも水分通導機能障害を起こしているのかを必ずしも明らかにしていない. また, 水分通導

機能障害は通水系の水中に気泡が形成され、この気泡が拡大して起きるとこれまで考えられているが、立木の内部でこのような現象が起きているのかについても未だ明確には解明されていない。加えて、水分通導機能障害が起きている通水系内の水の量や存在領域は明らかになっていない。樹木がどのように水分通導を行い、水分通導を行っている通水系にいつ、どのようにして水分通導機能障害が起きるのかを解明するためには、木部の水分を直接観察して組織学的な検討を加える必要があると考える。そこで本論文では以下のような目的で研究を行った。

1.3 本論文の目的

広葉樹の環孔材樹木と散孔材樹木では水分通導を行う木部の範囲が異なり、散孔材樹木では辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲の道管で、環孔材樹木では当年の孔圏道管でおもに水分通導が行われると考えられている (Chaney and Kozlowski, 1977 ; Ellmore and Ewers, 1986) 。したがって、環孔材樹木では孔圏道管は形成完了後 1 年以内に水分通導機能障害を起こし再び回復することがないと考えられている。広葉樹の水分通導の季節変化と水分通導機能障害を組織学的に研究するためには、1 年の期間に水分通導機能障害を確実に起こすと考えられる孔圏道管をもつ環孔材樹木を供試木として用いるのが有効であると考え。さらに、散孔材樹木の道管が環孔材樹木のそれと異なり、少なくとも数年間にわたって水分通導機能を維持できる仕組みについても検討する必要がある。

これらのことを組織学的に検討するためには、まず、樹木内部の水の存在を立木での状態から変化させずに観察する必要がある。そこで、本研究では立木状態での木部水分分布を細胞単位で視覚化する手法の検討を第 1 の目的とした。

ついで、この手法を用いて環孔材樹木と散孔材樹木における水分通導の季節

変化と水分通導機能障害の発生について組織学的に検討し、水分通導機能障害の原因として考えられているキャビテーションがどのように進行していくのかを明らかにすることを第2の目的とした。

供試木として、木部の凍結とキャビテーションとの関係を検討するため、環孔材樹木としては冬期間に気温が零度以下になる北海道に生育するヤチダモ (*Fraxinus mandshurica* var. *japonica* Maximowicz) を用いた。散孔材樹木としては同様に北海道に生育するシラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica* Hara) とオノエヤナギ (*Salix sachalinensis* Fr. Schmidt) を用いた。カバノキ属の樹木においては開葉前の木部に正圧が測定されたことがこれまでも報告されている (Merwin and Lyon, 1909; Kramer and Kozlowski, 1960; Sperry, 1993; Hacke and Sauter, 1996a) が、ヤナギ属ではこれまで報告例がない。また、シラカンバにおいては開葉前の時期に樹幹からの溢泌現象が報告されている (寺沢, 1996) が、オノエヤナギでは報告例がない。以上の点から、両樹種では開葉前の木部における正圧が大きく異なると考えられる。

本論文は6章で構成されている。第1章の緒論に引き続き、第2章では、環孔材樹木であるヤチダモを用いて、低温走査電子顕微鏡 (以下 Cryo-SEM と略記する) により木部水分分布の観察が可能かどうかを検討した。樹木が蒸散を行っているとき水分通導を行っている通水系内は負圧になっていると考えられ、試料採取時に通水系が切断されると、通水系内に周囲の空気が侵入して立木時の水分状態が変化してしまう可能性が指摘されていた (Crafts, 1939; Zimmermann and Brown, 1971)。そこで立木状態での試料の固定法の検討を行った。同時に、プレッシャーチャンバー法を用いて木部圧ポテンシャルを測定し、採取時の木部の水ポテンシャルと試料採取法との関連を検討した。さらに Cryo-SEM の補助的な手段として立木染色法を用いることにより、水分通導に関与している通

水系が特定できるかどうかを検討した。

第 3 章では、第 2 章で検討された試料採取法および観察法に基づき、環孔材樹木であるヤチダモ（15 年生）の木部水分分布の季節変化を Cryo-SEM で観察した。また、15 年生ヤチダモで当年の孔圏道管にキャビテーションが起きたと考えられた秋期から冬期にかけて、3、4 年生ヤチダモを用いて同様に木部水分分布の変化を Cryo-SEM で観察した。これらの Cryo-SEM による観察結果をもとに、水分通導に関与している通水系を明らかにするため立木染色法による観察を行った。

第 4 章においては、第 2 章で開発された試料採取法および観察法に基づき、散孔材樹木であるシラカンバとオノエヤナギの枝を用いて木部水分分布の季節変化を Cryo-SEM で観察した。また、散孔材樹木では水分通導が辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲の道管で行われると考えられている（Kramer and Kozlowski, 1960 ; Kozlowski and Winget, 1963）ため、10～16 年生のシラカンバの樹幹を用いて辺材の外層部から内層部にかけての木部水分分布の変化を Cryo-SEM により観察した。さらに、夏期にシラカンバの樹幹を用いて立木染色法により水分通導に関与している通水系を検討した。

第 5 章では、第 3 章でヤチダモにおける自然条件下でのキャビテーションが木部の凍結に起因することが考えられたため、4 年生ヤチダモを用いて人工的に凍結・融解処理を施し、凍結・融解過程での木部水分分布の変化を Cryo-SEM を用いて観察し、ヤチダモの当年の孔圏道管におけるキャビテーションの進行過程について検討した。同時に、凍結ストレスを人工的に回避させた場合の 3、4 年生ヤチダモの木部水分分布の変化も検討した。さらに、凍結・融解過程で当年の孔圏道管の内こうの水がどこに移動するのかを特定するため、蛍光染料を 3、4 年生ヤチダモの当年の孔圏道管に吸引させた試料に凍結・融解処理を施し、共

焦点レーザ走査顕微鏡（以下 CLSM と略記する）法により観察した。

第 6 章では、以上の知見をまとめ、本論文で用いた Cryo-SEM による木部水分分布の観察法の有効性と問題点について検討し、ヤチダモ、シラカンバ、オノエナギにおける水分通導と水分通導機能障害に関する総合考察を行った。

注 1) 本論文での和名と学名の記載については“北海道の樹種とその学名（北方林業会，1981）”に記されている標準和名と学名を適用した。“北海道の樹種とその学名”に記載されていない外来樹種の和名は、学名のうち種名または変種名をそのまま読んで、これに“新日本植物誌顕花篇（大井，1983）”および“原色日本植物図鑑木本編（Ⅰ）・（Ⅱ）（北村と村田，1971，1979）”に記されている標準属名をつづけて和名とした。

しかし、文献を引用する際に“北海道の樹種とその学名”，“新日本植物誌顕花篇”，“原色日本植物図鑑木本編（Ⅰ）・（Ⅱ）”のいずれにも属名の標準和名が記載されていない植物種もあった。その場合には引用文献に記載されていた学名のみをそのまま記載した。

注 2) 本論文では大気圧を基準とし、大気圧より正の圧力を正圧、大気圧より負の圧力を負圧と記載した。

注 3) 本論文では木部の水分通導に限定して論じており、木部における水分通導を“水分通導”と記載した。

注 4) 本論文では辺材の樹皮に近い部分を辺材の外層部、辺材の髄に近い部分を辺材の内層部とした。

第2章 Cryo-SEMによる木部水分分布の観察法

2.1 はじめに

樹木において水分通導を行っている通水系を特定する試みはこれまで数多くなされてきた。樹幹の木部において水分通導に関与している部位を明らかにする方法としてはこれまで立木染色法が多く用いられている (Greenidge, 1957b ; Kozlowski and Winget, 1963 ; Chaney and Kozlowski, 1977) 。供試木に注入する染料の種類は研究者によって異なり, Greenidge (1957b) や Kozlowski and Winget (1963) は酸性フクシンを, Chaney and Kozlowski (1977) は塩基性フクシンを用いているが, いずれの染料を用いても通水系に染料の上昇が観察されている。これらの報告は, 散孔材樹木や針葉樹では辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲に染料の上昇が観察されるのに対して, 環孔材樹木ではおもに当年の木部に染料の上昇が観察されるという点では一致している。しかし, 立木染色法は木部における染料の局在を観察する方法であり, 立木の通水系内の水の移動を直接観察する方法ではない。広葉樹に染料注入を行った際に道管以外にも, 柔細胞や木部繊維にも染色が観察されることがある。この時, 染色された柔細胞や木部繊維は水分通導を行っていたのか, それとも道管からの染料の拡散により染色されたのかを区別することは難しい。多くの研究者は染料の上昇を道管に限って記述しているが, 萌芽枝の元口を1% サフラニン水溶液に浸した実験の結果から樹種によっては繊維状細胞も水分通導に関与しているものがあるという報告もある (宮田と佐伯, 1984) 。

樹幹内部の水分の分布や量的な変動を把握する試みとしては, 採取した試料の生材重量と全乾重量または飽水時の重量から含水率を算出して, 採取部位や採取時期の違いによる含水率の変動を調べる研究がおもに行われている (Clark

and Gibbs, 1957 ; Gibbs, 1958 ; Kozlowski, 1958 ; 矢沢, 1960, 1964 ; 矢沢ら, 1963 ; Yazawa et al., 1965 ; Yazawa and Ishida, 1965a) . 季節別に採取した円盤をブロックに分割し, それぞれのブロックの含水率を測定する方法により, いくつかの樹種では辺材の含水率に季節変化があることが報告されている (Clark and Gibbs, 1957 ; Gibbs, 1958) . また, 一部の樹種の含水率について, 樹幹内での辺・心材および地上高による違い (矢沢, 1960, 1964 ; 矢沢ら, 1963) や, 辺・心材別および地上高別の季節変化が報告されている (Yazawa and Ishida, 1965a ; 内海, 1994) . さらに, 木部内での水の局在を調べるために, 木部を放射方向に連続的に 250~500 μ m 厚の薄片に細かく分割して含水率の変化を調べている報告もある (Yazawa and Ishida, 1965b) . しかし, これらの手法では細胞レベルでの水の局在を知ることは困難である.

木部内の細胞に含まれる水を視覚化しようとする試みはこれまでも行われており, Wiegand (1906) はカエデ属の数樹種の木部の冬の試料から水中または油中で剃刀を用いて切片を作製し光学顕微鏡で観察している. その結果, 道管の内こうには水が存在し, 木部繊維の内こうにはほとんど水が存在していなかったと報告している. Sucoff (1969) は冬期間の気温が -19°C まで低下した日に採取したストロブマツとバンクシアナマツにおいて, 16 μ m 厚の板目面の凍結切片を作製し氷点下の戸外で光学顕微鏡により観察したところ, 内こうに気泡を含む仮道管が観察されたと報告している. また 100~150 μ m 厚の切片を用いてカンノンチク (*Rhapis excelsa* (Thunb.) Henry) の葉柄の道管や, ニオイヒバ (*Thuja occidentalis* L.) の仮道管の内こうに存在する水の観察もこれまでに行われている (Sperry, 1985, 1986 ; Lewis et al., 1994 ; Lewis and Berg, 1996) . また, Zimmermann (1965, 1983) はドライアイスを用いて供試木を立木状態で凍結した後に切断し, 剃刀で平滑に仕上げた木

部表面を実体顕微鏡で観察することにより、大径の道管の内こうに氷の存在が確認できたことを報告している。

草本植物においては核磁気共鳴（以下 NMR と略記する）顕微鏡法を用いて葉がついている状態で木部の水分分布を観察する試みも行われている（Xia et al., 1993 ; Bentrup, 1996 ; Kuchenbrod et al., 1996）．しかし、凍結切片を光学顕微鏡で観察する手法は樹種によっては試料作製が困難であると報告されており（Sucoff, 1969），また、実体顕微鏡や NMR 顕微鏡を用いた観察では小径の道管や木部繊維の内こうの水の存在状態を把握することは難しい。

軟X線写真法は、木部内の水の局在を広い範囲にわたって観察できる方法であり（石田ら, 1967 ; 今と深沢, 1985 ; 李ら, 1985 ; Sano et al., 1995, 佐野, 1996），木部水分分布の季節変化を観察することも可能である（内海ら, 1994）．しかし、軟X線写真観察法では黒い遮光紙の袋に入れたフィルムの上に試料をのせて撮影を行い、このフィルムを引き延ばして印画紙に焼き付けて観察を行うため、細胞内こうの水の存在状態が観察できる程度の十分な拡大倍率が得られない．また、この手法では約 2mm 厚（内海ら, 1994）の薄材片を作製して観察を行うため、試料作製時にとくに大径の道管の内こうから水が消失してしまう可能性がある。

これらの手法に比べて、Cryo-SEM 法は生材試料を凍結固定した後に試料を凍結状態のまま観察する方法であることから、試料中の水分を氷の状態で観察でき、材中の水分の局在を電子顕微鏡レベルで可視化するのに適した方法である（Ohtani and Fujikawa, 1990 ; 佐野ら, 1993 ; Sano et al., 1995 ; 佐野と藤川, 1995 ; 佐野, 1996）．しかし、Cryo-SEM 法を用いた観察においても試料の採取法および作製法を考慮しないと立木の水分状態を把握することが困難になる．通常 Cryo-SEM による観察では試料を凍結状態で切断して観察す

る方法（凍結割断法）が用いられている（Fujikawa et al., 1988；藤川ら, 1989；黒田, 1998）が，この手法ではとくに木口面の観察を行う場合に木材組織や氷晶の破片が割断面の大部分の領域を覆ってしまうことがある（佐野と藤川, 1995）．これに対して，佐野ら（1993）によって開発された凍結状態のままスライディングマイクロームを用いて試料の表面を切削する凍結切削法では，木口面の観察においても細胞の輪郭やその内こうの水の状態を試料内の広い範囲にわたって判別できる（Sano et al., 1995；佐野と藤川, 1995；佐野, 1996）．

本論文では，木部の細胞内こうの水分状態を広い範囲にわたって把握する必要があり，凍結切削法を用いて試料を作製した．本章では，この手法による Cryo-SEM の利点と欠点について検討した．また，蒸散を行っている供試木より試料を採取する場合，切断された通水系に周囲の空気が侵入して立木時の水分状態から変化してしまう可能性が指摘されており（Crafts, 1939；Zimmermann and Brown, 1971），立木の木部水分分布からの変化の少ない試料採取法を検討した．また，試料採取時にプレッシャーチャンバー法を用いて木部圧ポテンシャルを測定し，木部内の水ポテンシャルと試料採取法との対応を検討した．さらに Cryo-SEM 法では木部に存在する水分が水分通導に関与しているのかどうかを特定することは出来ないため，Cryo-SEM 法の補助的な手段として立木染色法を併用することによって水分通導に関与している通水系が特定できるかどうかについても検討した．

2.2 実験方法

2.2.1 供試木

北海道大学農学部附属中川地方演習林 204 林班に植栽されていた樹高約 8m，胸高直径約 8cm の 15 年生のヤチダモおよび北海道大学農学部附属演習林苗畑

(札幌)に植栽されていた樹高約 2m、地上高 80cm の部位での直径約 2cm の 4 年生のヤチダモを供試木として用いた。

2.2.2 Cryo-SEM 法

1) 試料採取方法

15 年生のヤチダモを供試木として以下の 3 種類の試料採取法を検討した。

第一に、林地で手鋸を用いて前処理無しに供試木を伐採し、胸高部を含む 1 m 長の丸太に分割して両切断面にワセリンを塗布した後、アルミホイルで包みビニールテープで固定して防水処理をした。この丸太を約 6 時間後に冷凍室内 (-20°C) に入れ、丸太中の水分を凍結させ、保存した。これを低温室凍結法とした。

第二に、低温室凍結法と同様に試料を伐採し、直ちに手鋸を用いて胸高部から約 2cm 厚の円盤を切り取り、鉋を用いて最外数年輪を含むように切断した。切断した試料を速やかにサンプル瓶内の液体窒素 (-196°C) 中に入れて凍結させ、液体窒素温度で保存した。これを液体窒素凍結法とした。

第三に、直径 30cm のプラスチック製の漏斗の一端をカッターで切り裂き、この漏斗で供試木を取り囲み、漏斗の下端を胸高部の樹幹に密着させた後、カッターで切り裂いた部分が重ね合うようにして巻き込み、液が漏れないように漏斗の側面をガムテープで固定した。つぎに、下方向に液が漏れないように漏斗の下端に工作用紙粘土を詰めて漏斗と樹幹の間隙を埋めた。最後に漏斗の外側からガムテープを巻いて補強して液漏れを防ぎ、漏斗による液溜を完成させた。この液溜に液体窒素を注いで 10 分間樹幹が液体窒素と接触するようにして立木状態で凍結させた。15 年生の別の供試木の辺材内層部まで熱電対を挿入し、立木状態で液体窒素を用いて凍結させたところ 10 分以内に辺材内層部の

温度は -10°C 以下になった。この温度は木部のアポプラストの水が凍結すると考えられている温度よりも低い（黒田，1998）。供試木を凍結部位より下部から手鋸を用いて伐採した。直ちに手鋸を用いて凍結部位から約 2cm 厚の円盤を切り取り，鉋を用いて外側数年輪を含むように切断した。切断した試料を林地において速やかに液体窒素の入ったサンプル瓶に入れ，液体窒素温度で凍結させ，保存した。これを立木液体窒素凍結法とした。

以上の試料採取法の模式図を Fig. 2.1 に示す。

2) 水ポテンシャルの測定と試料採取

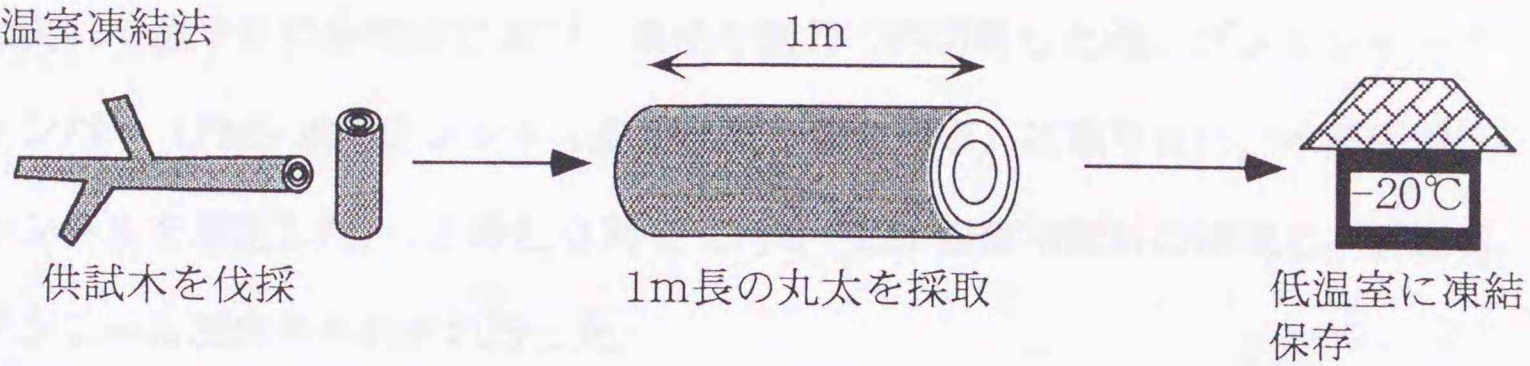
木部の水ポテンシャル低下時（日中）と木部の水ポテンシャル上昇時（夜間）における試料採取法の検討を行った。

1998 年の 10 月に 4 年生のヤチダモを地上高約 50cm の部位で伐採し，速やかに液体窒素の入ったサンプル瓶に伐採部位を 5 分間入れ，急速凍結させた。試料をサンプル瓶から取り出し，手鋸を用いて凍結部位から約 15cm 長の樹幹を切断し，再び液体窒素の入ったサンプル瓶に入れ，液体窒素温度で凍結保存した。これを液体窒素凍結法による試料採取とした。

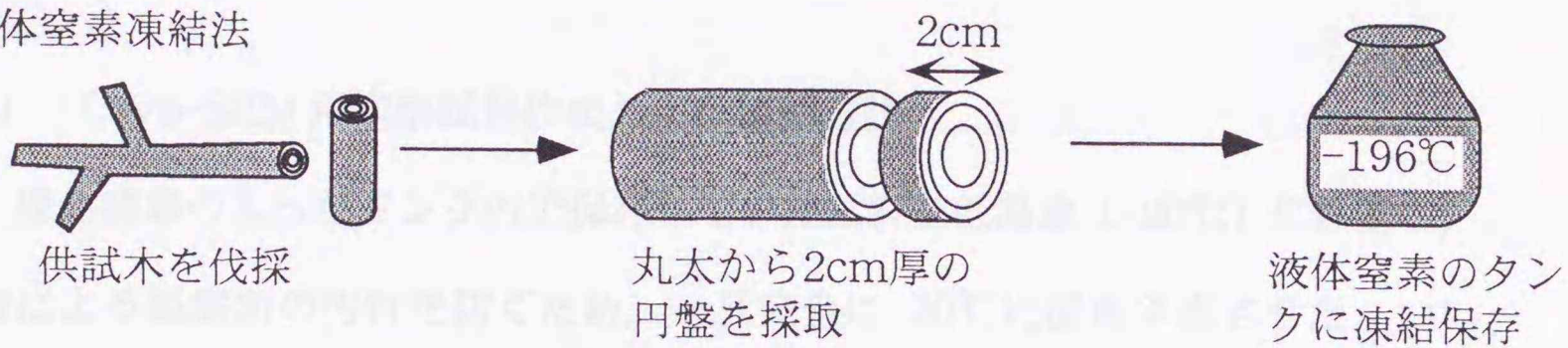
直径 15cm のプラスチック製の漏斗を使い，15 年生ヤチダモにおける立木液体窒素凍結法と同様に処置して液溜を供試木の樹幹に取り付けた。この液溜に 5 分間樹幹が液体窒素に接触するようにして立木状態で凍結させ，供試木を凍結部位より下部から手鋸を用いて伐採した。凍結部位から約 15cm 長の樹幹を手鋸を用いて切断し，林地において速やかに液体窒素の入ったサンプル瓶に入れ凍結保存した。これを立木液体窒素凍結法による試料採取とした。

Cryo-SEM 観察のための試料採取後，それぞれの供試木から各 3 枚の葉をカッターを用いて採取し，黒色のビニール袋に包んだ後，発泡スチロール製の箱

・低温室凍結法



・液体窒素凍結法



・立木液体窒素凍結法

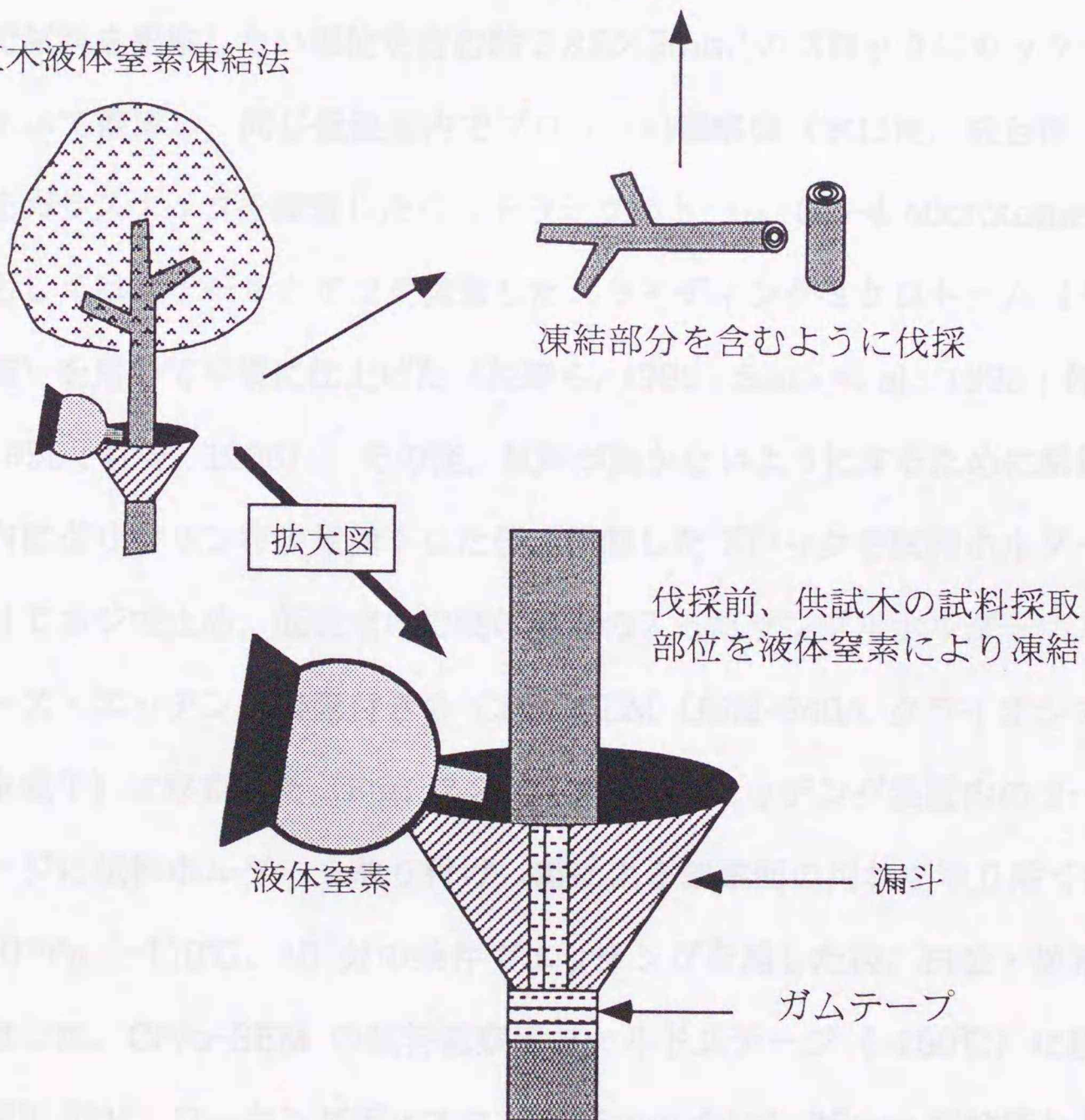


Fig. 2.1 Cryo-SEM用試料採取方法.

に入れて速やかに研究室に運び、葉柄を剃刀で再切断した後、プレッシャーチャンバー（PMS 水ポテンシャル測定装置；盟和商事）に取り付け、木部圧ポテンシャルを測定した。12 時と 0 時に Cryo-SEM 観察用試料の採取と木部圧ポテンシャル測定をそれぞれ行った。

3) Cryo-SEM 用観察試料作製および観察方法

液体窒素の入ったタンク内で保存していた試料を低温室（ -20°C ）に移動し、霜による観察面の汚れを防ぐため、一旦完全に -20°C に温度平衡させた。ついで試料を観察したい部位を含む約 $5 \times 5 \times 5 \text{mm}^3$ のブロックにカッターと剃刀を用いて整形し、同じ低温室内でブロックの観察面（木口面、板目面、柃目面）をガラスナイフを装着したウルトラミクロトーム（JB-4 Microtome；Solvall）もしくはスチールナイフを装着したスライディングミクロトーム（大和光機工業）を用いて平滑に仕上げた（佐野ら, 1993；Sano et al., 1995；佐野と藤川, 1995；佐野, 1996）。その後、試料が動かないようにするために試料ホルダー内にグリセリンを少量滴下した後、作製したブロックを試料ホルダーに取り付けてネジで止め、低温室内で液体窒素の入ったサンプルホルダーに入れ、フリーズ・エッチング装置付きの Cryo-SEM（JSM-840A クライオシステム；日本電子）に移動した（Fig. 2.2）。フリーズエッチング装置内のコールドステージに試料ホルダーを取り付け、霜による観察面の汚れを取り除くため、 $1 \times 10^{-4} \text{Pa}$ 、 -110°C 、10 分の条件でエッチングを施した後、白金・炭素を真空蒸着した。Cryo-SEM の試料観察用コールドステージ（ -160°C ）に移し、加速電圧 5kV、ワーキングディスタンス 15mm ないし 25mm で検鏡および写真撮影を行った（Fujikawa et al., 1988；藤川ら, 1989）。

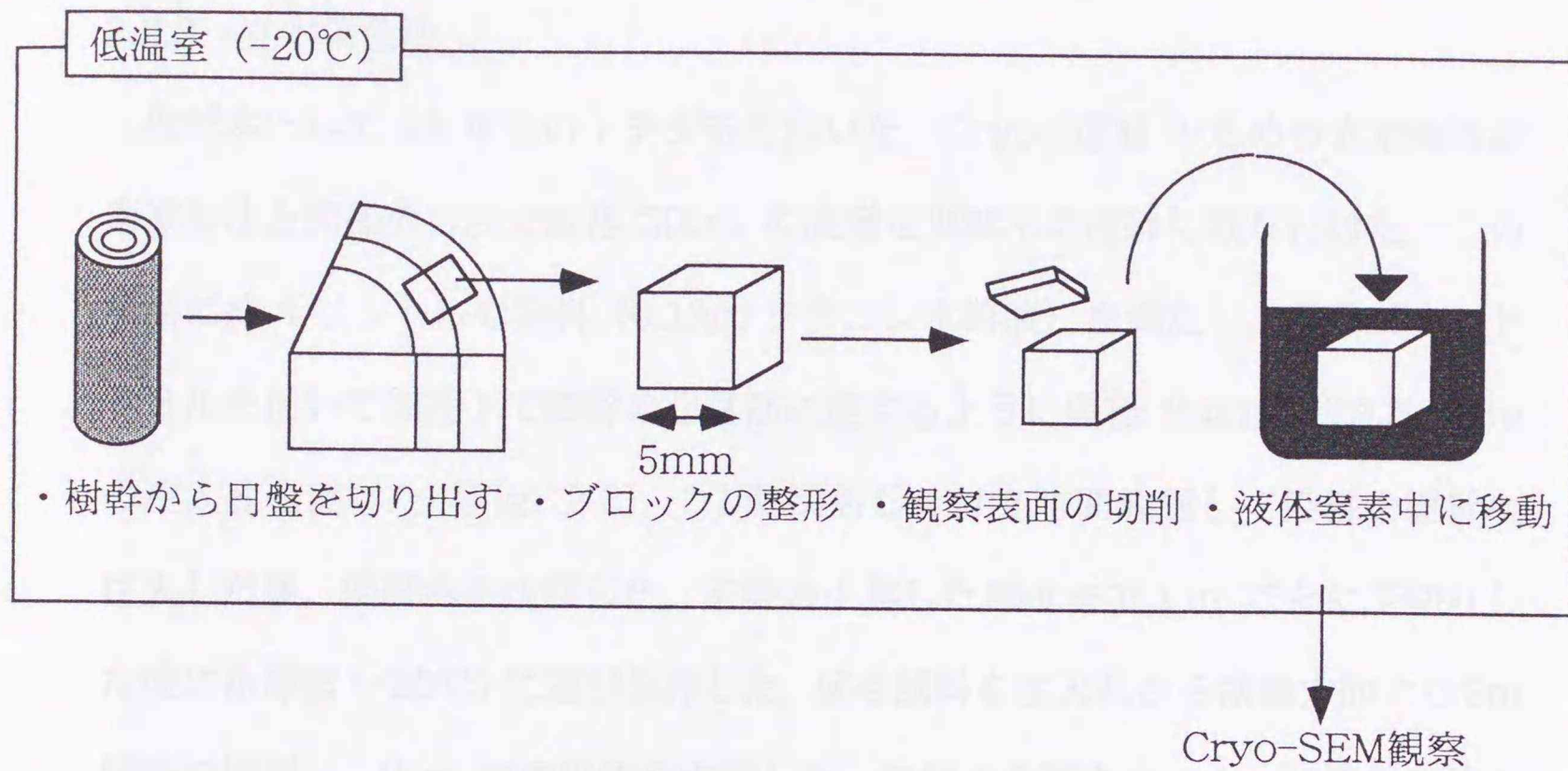


Fig. 2.2 Cryo-SEM用試料作製法.

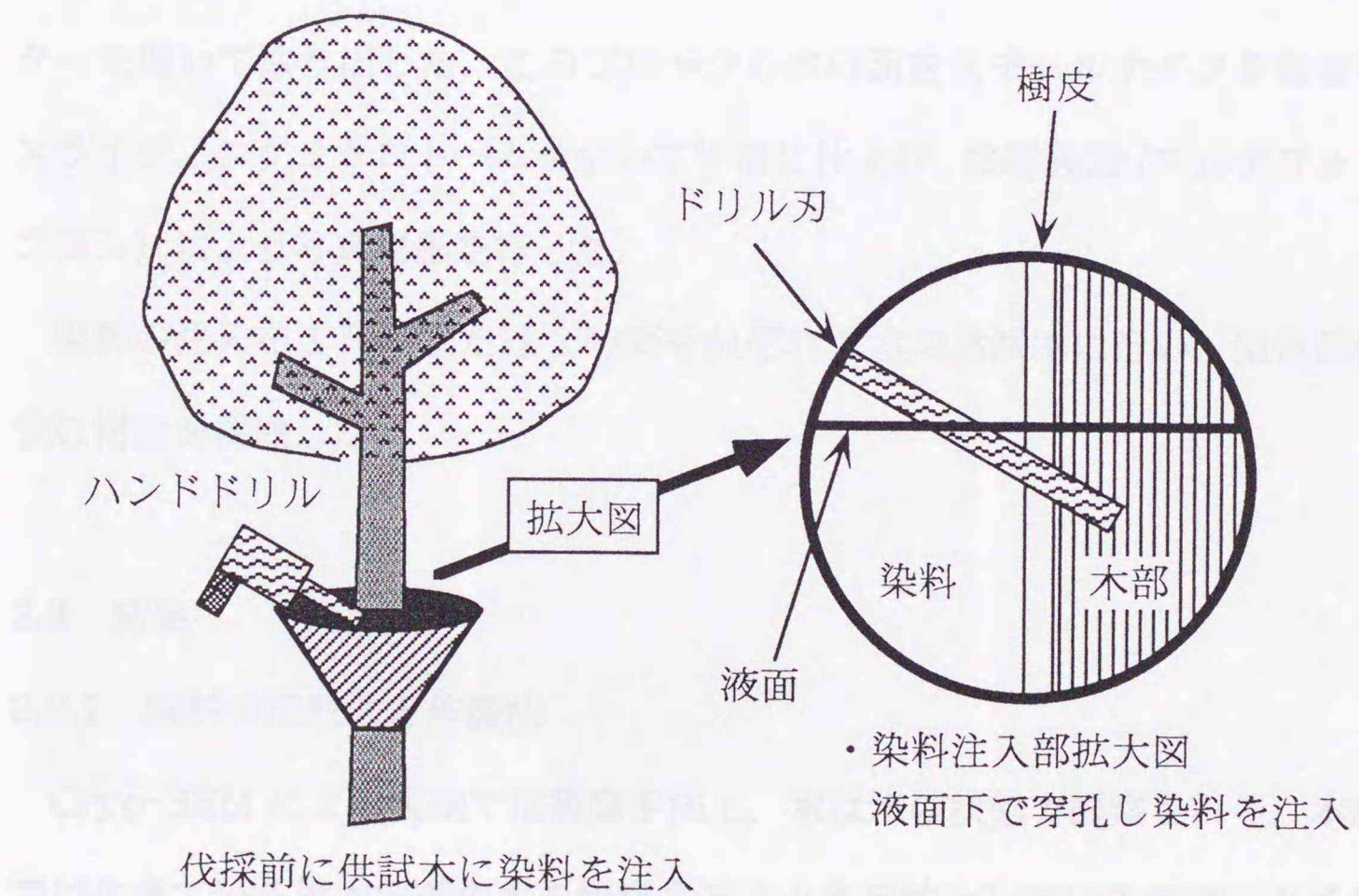


Fig. 2.3 立木染色法.

2.2.3 立木染色法

供試木として 15 年生のヤチダモを用いた。Cryo-SEM のための立木液体窒素凍結法と同様の方法で直径 30cm の液溜を供試木の樹幹に取り付けた。この液溜に約 4 リットルの染料 (0.1%サフラニン水溶液) を満たし、電動式ハンドドリルを用いて液面下で樹幹の心材部に達するように直径 8mm、深さ約 4cm の注入孔を開けた (Fig. 2.3)。1 時間もしくは 2 時間放置して染料を樹幹に注入した後、供試木を伐採した。染料の上昇した部位まで 1 m ごとに玉切りした後、冷凍室 (-20℃) に運び保存した。保存試料を注入孔から樹軸方向に 0.5m 間隔で切断し、2cm 厚の円盤を作製した。円盤の表面をカッターで平滑に仕上げ、木口面全体の写真撮影をカメラ (F-4; ニコン) を用いて行った。円盤中で染料の上昇が肉眼で観察された部位より外側数年輪を含む小ブロックをカッターを用いて取り出した。このブロックの木口面をスチールナイフを装着したスライディングミクロトームを用いて平滑に仕上げ、接写装置 (マルチフォト; ニコン) により写真撮影を行った。

染料の注入を 1 時間または 2 時間それぞれ 1 本の供試木に行い、染色部位を含む樹幹を採取した。

2.3 結果

2.3.1 試料の採取法と作製法

Cryo-SEM による観察では観察手法上、水は氷の状態で観察される。本論文では生きている樹木内部の水を観察することを目的としているので、とくに断らない場合は木部に存在する氷を水として記述する。

Fig. 2.4A は 4 年生ヤチダモの凍結切削法により作製した木口面の試料である。写真は当年の孔圏部の一部を示しており、孔圏道管 (v) の一部、軸方向

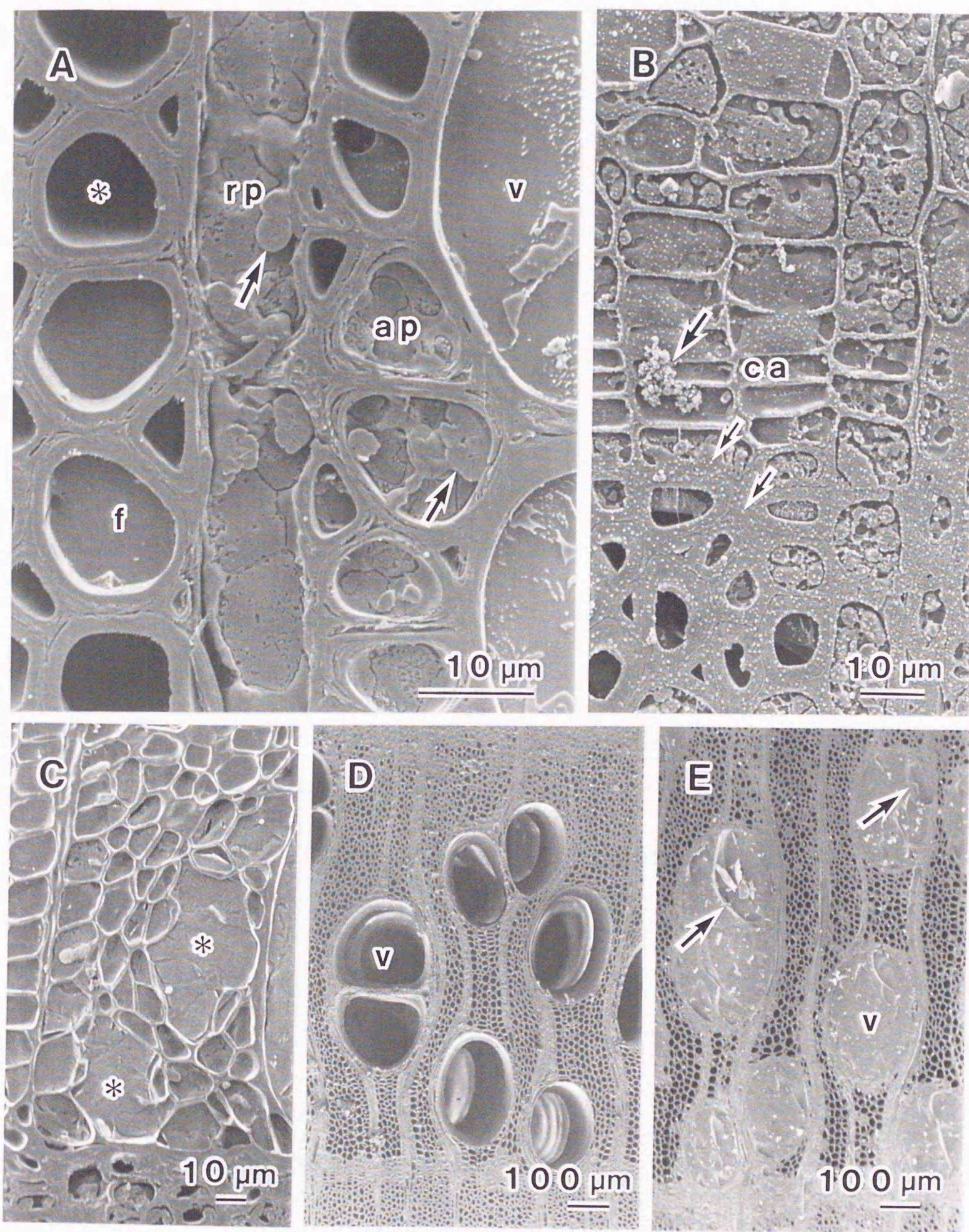


Fig. 2.4 ヤチダモの Cryo-SEM 写真. 木口面. A, 当年の孔圏部. v は道管, ap は軸方向柔細胞, rp は放射柔細胞, f は水が充満している木部繊維, アステリスクは水が見られない木部繊維, 矢印は原形質を示す. B, 形成層帯 (ca) と前年の木部. 小矢印は粒子状の付着物, 大矢印は比較的大きな付着物を示す. C, 低温窒素凍結法による 5 月の当年木部. アステリスクは氷晶を示す. D, 液体窒素凍結法による 8 月の当年の孔圏部. v は道管を示す. E, 立木液体窒素凍結法による 8 月の当年の孔圏部. v は道管, 矢印は凹部を示す.

柔細胞 (ap) , 放射柔細胞 (rp) , 木部繊維 (f) の輪郭およびそれらの内こうが明確に観察される。孔圏道管の内こうは水で満たされているが、木部繊維の内こうは水で満たされているもの (f) と、水が存在していないもの (アステリスク) がそれぞれ見られる。道管と木部繊維の内こうの水は比較的平滑であり、エッチング処理により切削面よりも全体が窪んでいることがわかる。これに対して軸方向柔細胞と放射柔細胞の内こうの原形質には、エッチング処理後も切削面とほぼ同じ高さの部分 (矢印) と切削面より窪んでいる部分があることがわかる。以下、本論文での Cryo-SEM による結果はすべて凍結切削法を用いて試料を作製し観察したものである。

観察試料には試料作製時に生じたと考えられる付着物が観察面上に存在した。Fig. 2.4B は 4 年生ヤチダモの形成層帯 (ca) 付近の木口面である。観察面全体に直径約 $0.5\mu\text{m}$ の粒子状の付着物が見られる (小矢印)。また形成層帯には長さ約 $10\mu\text{m}$ の比較的大きな付着物が見られる (大矢印)。

Cryo-SEM 観察のための試料の採取法として低温窒素凍結法、液体窒素凍結法、立木液体窒素凍結法の 3 手法を検討した。低温窒素凍結法を用いて作製した 5 月の 15 年生の試料について当年および前年木部の木口面観察を行ったところ、当年の木部に形成中の木部繊維、柔細胞、孔圏道管が観察された。形成中の木部繊維と柔細胞の内こうには原形質が見られた (Fig. 2.4C)。当年の分化中の木部には氷晶析出による組織の変形や破壊がみられた (Fig. 2.4C, アステリスク)。

液体窒素凍結法を用いて作製した 8 月の 15 年生の試料について木口面観察を行ったところ、当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水が見られなかった (Fig. 2.4D, v)。また、当年の孔圏部の多くの木部繊維の内こうにも水が見られなかった。放射柔細胞と軸方向柔細胞には原形質が存在した。

立木液体窒素凍結法を用いて作製した 8 月の 15 年生の試料について木口面観察を行ったところ、液体窒素凍結法とは異なり当年の孔圏道管の内こうは水で満たされていることが観察された (Fig. 2.4E, v) . この観察試料の当年の孔圏道管の内こうの水の表面の一部に周囲の水の表面よりさらに窪んでいる部分が存在した (Fig. 2.4E, 矢印) . 当年孔圏部の多くの木部繊維の内こうには水が見られなかった.

2.3.2 試料の採取法と水ポテンシャルとの対応

10 月の日中 (12 時) および夜間 (0 時) に液体窒素凍結法および立木液体窒素凍結法を用いて試料を採取し、Cryo-SEM による観察を行った. 試料採取と同時に木部圧ポテンシャルの測定も行った.

液体窒素凍結法を用いて作製した 10 月の 12 時の試料を用いて当年孔圏部の木口面観察を行ったところ、多くの道管の内こうにはほとんど水が存在せず一部に水が存在するだけであった (Fig. 2.5A, 矢印) . 板目面での当年の孔圏部の観察を行ったところ、道管 (Fig. 2.5B, v) 内こうの一部には水が観察された. しかしこれらの水は球形をしておらずチャージングを起こしているものがあつた (Fig. 2.5B, 大矢印) . 木部繊維の内こうには水が見られるものもあつた (Fig. 2.5B, 小矢印) . 試料採取時、供試木の木部圧ポテンシャルの値は $-1.07 \pm 0.18 \text{MPa}$ であつた.

これに対して、立木液体窒素凍結法を用いて作製した 12 時の試料の木口面での当年孔圏部の観察を行ったところ、ほとんどの道管の内こうは水で満たされていた (Fig. 2.5C, 矢印) . 板目面での当年孔圏部の観察を行ったところ、道管 (Fig. 2.5D, v) の内こうは完全に水で満たされていた. 孔圏道管の内こうの水の表面の一部に、周囲の水の表面よりさらに窪んでいる部分が存在した

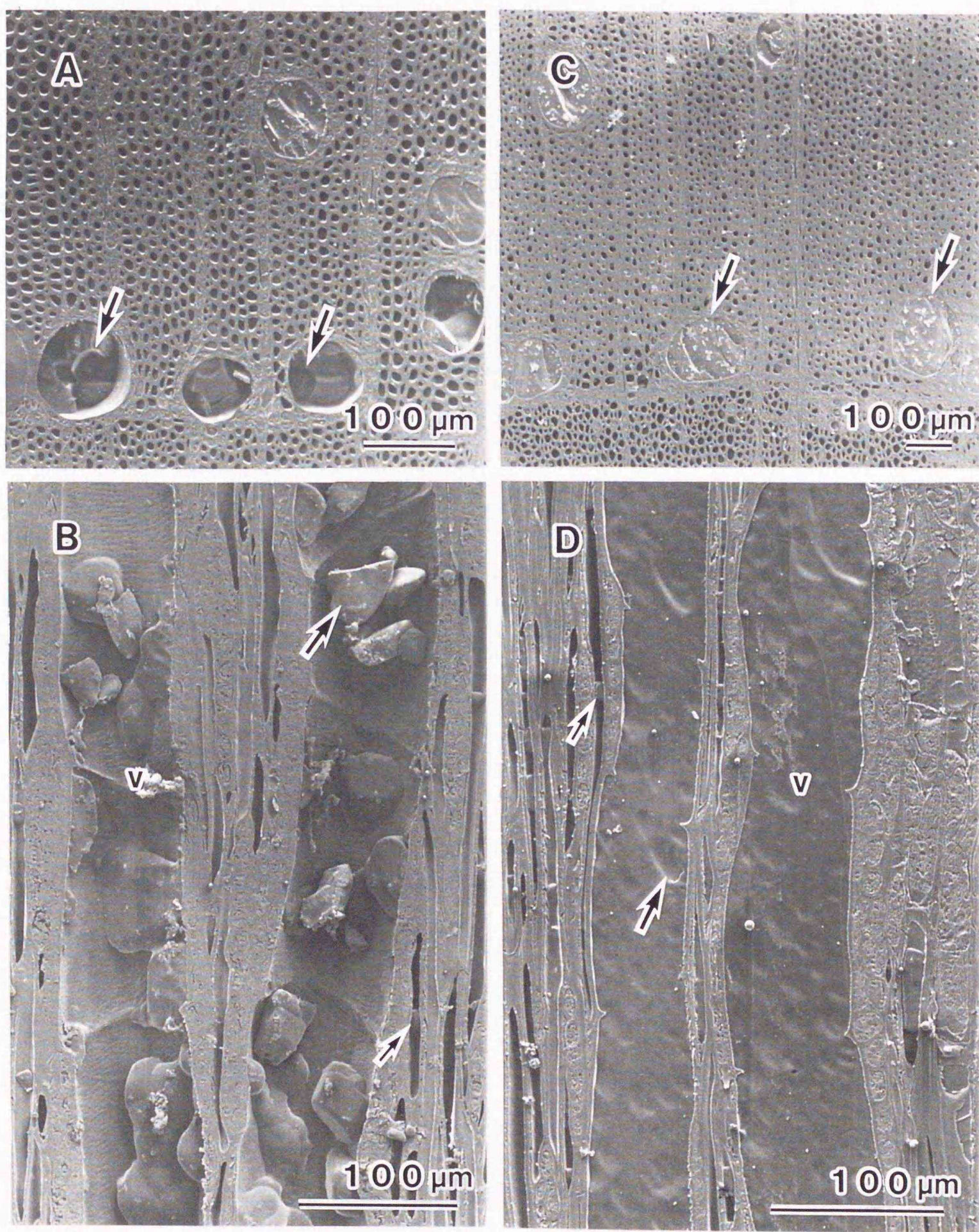


Fig. 2.5 ヤチダモの 10 月の Cryo-SEM 写真. 当年の孔圏部. A, 液体窒素凍結法. 12 時の採取試料. 木口面. 矢印は道管内こうの水を示す. B, 液体窒素凍結法. 12 時の採取試料. 板目面. 大矢印は道管内こうの水, 小矢印は木部繊維内こうの水, v は道管を示す. C, 立木液体窒素凍結法. 12 時の採取試料. 木口面. 矢印は水で満たされた道管を示す. D, 立木液体窒素凍結法. 12 時の採取試料. 板目面. 大矢印は凹部, 小矢印は木部繊維内こうの水, v は道管を示す.

(Fig. 2.5D, 大矢印). また内こうに水が見られる木部繊維もあった (Fig. 2.5D, 小矢印). 試料採取時, 供試木の木部圧ポテンシャルの値は $-0.73 \pm 0.44 \text{ MPa}$ であった.

0 時に採取した試料においては, 液体窒素凍結法, 立木液体窒素凍結法, いずれの処理をした試料でも, ほとんどの当年孔圏道管の内こうは水で満たされていた. この時, 液体窒素凍結法と立木液体窒素凍結法により採取を行った供試木の木部圧ポテンシャルの値はそれぞれ $-0.06 \pm 0.01 \text{ MPa}$ と $-0.06 \pm 0.02 \text{ MPa}$ であり, 12 時の測定値と比べ高い値を示した.

2.3.3 立木染色試料の観察

立木染色を施した供試木の樹幹部を, 染料注入孔から樹軸方向に 0.5m ごとにそれぞれ観察した. 使用した染料はサフラニンであるため染色領域は赤色に観察された.

8 月に染料注入を 2 時間施した試料において, 染料注入孔より数 cm 上の部位 (以下, 染料注入部と略記する) では, 当年の孔圏道管および樹皮側から数えて 7 年輪目までの孔圏外道管とそれらの周囲の放射柔細胞, 軸方向柔細胞, 木部繊維に染色が見られた (Fig. 2.6A). これに対して, 注入孔上 0.5m の部位では当年の孔圏道管と孔圏外道管およびそれらの周囲の組織が染色されていた (Fig. 2.6B). 染料注入孔の樹軸方向上部の木部でも当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織が染色されているものと染色されていないもの (矢印) がそれぞれ存在した.

孔圏外道管とそれらの周囲の組織が染色されていたのは注入孔上 0.5m の部位までであり, 当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織は注入孔上 4.0m の部位まで染色されていた (Fig. 2.6C). 観察する部位が樹軸方向に高くなるにした

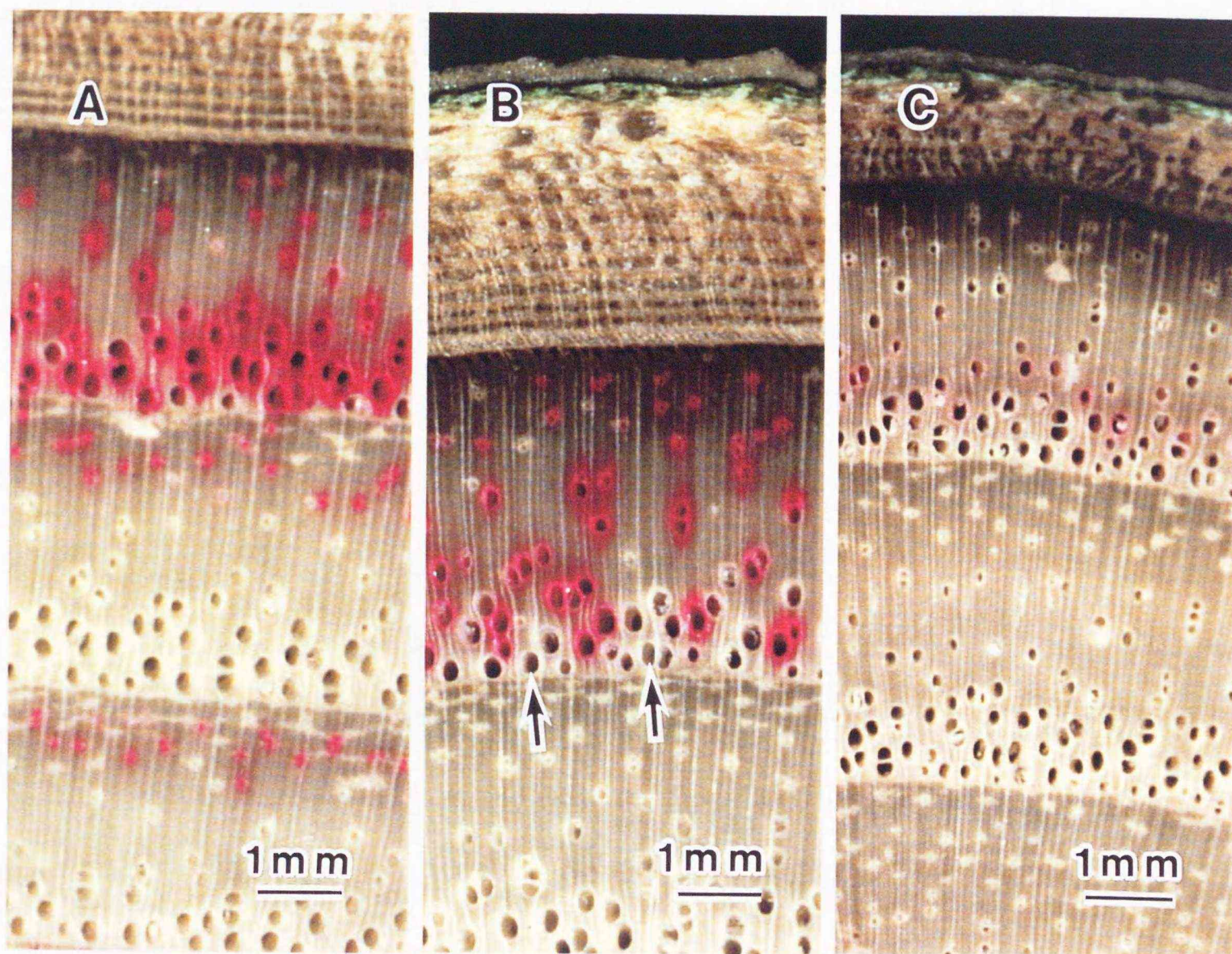


Fig. 2.6 ヤチダモの辺材外層部の立木染色写真. 木口面. A, 染料注入部.
B, 注入孔上 0.5m. 矢印は染色されていない道管を示す. C, 注入
孔上 4.0m.

がって、染色の程度が弱くなる傾向が見られた。また、せん孔部と同一方向の樹軸方向上部の木部でも当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織が染色されているものと染色されていないものがそれぞれみられた。

2.4 考察

試料採取法を検討するため3つの手法を用いて試料を凍結固定しCryo-SEMによる観察を行った。その結果、低温窒素凍結法では、分化中の木部や形成層帯の随所で氷晶析出により組織が変形あるいは破壊されることが明らかになった (Fig. 2.4C)。これは試料を凍結する際に低温室内 (-20°C) で比較的ゆっくりと凍結させたため、氷晶析出が進行したものと思われる。液体窒素凍結法では、液体窒素 (-196°C) を用いて試料を凍結させたため、比較的速やかに凍結が進行するので分化中の木部や形成層帯での氷晶析出は抑制され、形成中の木部の細胞、柔細胞、孔圏外道管の内こうの水の存否の観察も可能であった。しかし、液体窒素凍結法により8月に採取した試料において、当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水が存在していないのが観察された (Fig. 2.4D)。これに対して、立木液体窒素凍結法を用いた試料では、同時期の当年の孔圏道管の内こうが水で満たされているのが観察された (Fig. 2.4E)。蒸散に起因する葉の水ポテンシャル低下が樹幹の道管の内こうの水ポテンシャル低下を引き起こし、道管が試料採取時に切断された際に、それらの道管の内こうに周囲の空気が侵入してしまう可能性がこれまでも示唆されている (Crafts, 1939; Zimmermann and Brown, 1971)。液体窒素凍結法による試料で当年の孔圏道管の内こうに水がほとんど存在していなかった原因としては、試料採取時に道管の内こうが負圧になっていたために切断面から空気が侵入しキャビテーションが起きたことが考えられる。

日中と夜間に立木液体窒素凍結法と液体窒素凍結法により、それぞれ試料を採取して Cryo-SEM により観察した結果、日中（12 時）に採取した液体窒素凍結法による試料では多くの当年の孔圏道管の内こうにはあまり水が見られなかったが、立木液体窒素凍結法による試料では多くの当年の孔圏道管の内こうが水で満たされているという大きく異なる結果が得られた（Fig. 2.5）。しかし、夜間（0 時）に試料を採取した場合は、液体窒素凍結法と立木液体窒素凍結法のいずれの試料においても多くの当年の孔圏道管の内こうが水で満たされていた。成長期の樹木の木部圧ポテンシャルは通常負の値を示し、日の出前後から低下し始め日中に最低値に達した後、増加に転じ日の出前後に比較的大気圧に近い値に戻ると考えられている（佐藤と森川，1976；森川と佐藤，1976；高橋，1976；佐藤，1977）。本章の実験においても、日中の木部圧ポテンシャルが液体窒素凍結法により採取した供試木で $-1.07 \pm 0.18 \text{ MPa}$ であり、立木液体窒素凍結法により採取した供試木で $-0.73 \pm 0.44 \text{ MPa}$ であった。夜間の木部圧ポテンシャルは液体窒素凍結法と立木液体窒素凍結法で採取した供試木でそれぞれ $-0.06 \pm 0.01 \text{ MPa}$ と $-0.06 \pm 0.02 \text{ MPa}$ となり、日中と夜間で木部圧ポテンシャルが大きく異なっていた。これらの結果から、開葉時の日中のように蒸散が活発で木部圧ポテンシャルが低下していると考えられる際に Cryo-SEM 用の試料を採取する場合、立木液体窒素凍結法による試料採取が不可欠であると考えられる。しかし、開葉していない時期や、夜間の木部の水ポテンシャルが低下していない供試木から試料を採取する際には、液体窒素凍結法による試料採取でも比較的正确な結果が得られると考える。

凍結切削法を用いた Cryo-SEM による観察から、横断面と縦断面のいずれにおいても細胞の輪郭やその内こうの水分の存否を試料内の広い範囲にわたって観察できた。この結果は、これまでに凍結切削法により行われた Cryo-SEM

による観察の結果と一致する（佐野ら, 1993 ; Sano et al., 1995 ; 佐野と藤川, 1995 ; 佐野, 1996）．放射柔細胞や軸方向柔細胞の内こうには原形質が観察され、道管や木部繊維の内こうには水が観察された（Fig. 2.4A）．放射柔細胞や軸方向柔細胞の内こうの原形質にはエッチング処理後も切削面とほぼ同じ高さの部分と切削面より大きく窪んでいる部分があるのに対して、道管と木部繊維の内こうの水の観察面は比較的平滑であり、エッチング処理により試料の切削面より全体が窪んでいることで区別が可能である．凍結切削法を用いた Cryo-SEM 観察は、木部の構成細胞の内こうに存在している水分を細胞単位で正確に観察するのに有効な方法である．

しかし凍結切削法を用いても、立木状態での木部の細胞内こうの水の状態をそのまま観察することは困難である．道管の内こうに水が充満している場合、内こうの水の観察面で、他の領域より窪んでいるように見える部分が存在した（Fig. 2.4E, 2.5D）．これは試料の切削時に観察面の氷が剥離してできたものと考えた（Fig. 2.7）．切削時にミクロトームの刃は木部の組織とともに氷を切削するが、切削時に剥離する氷晶が大きかった場合、この切削面よりも下にある氷も剥離してしまい、この大きな氷晶が剥離した部分が観察時には窪みとして見えると考える．内こう全体に氷が見られ、一部の氷晶が剥離して見える道管は立木状態では内こうに水が充満していると考えられるので、以下このような剥離が見られた道管においても、水で満たされていると記述する．また、内こうに水がわずかに存在する試料においては水は球形ではなくさまざまな形をしているのが観察された（Fig. 2.5B）．原因として、試料の採取時や採取後の試料の移動や試料の保管の際に人為的に加えられた振動や衝撃により細胞壁に付着していた水が剥離してしまうことが考えられる．また、観察面の作製時に氷の切削により生じた氷晶片（Fig. 2.7）が氷の存在していない領域に落ち

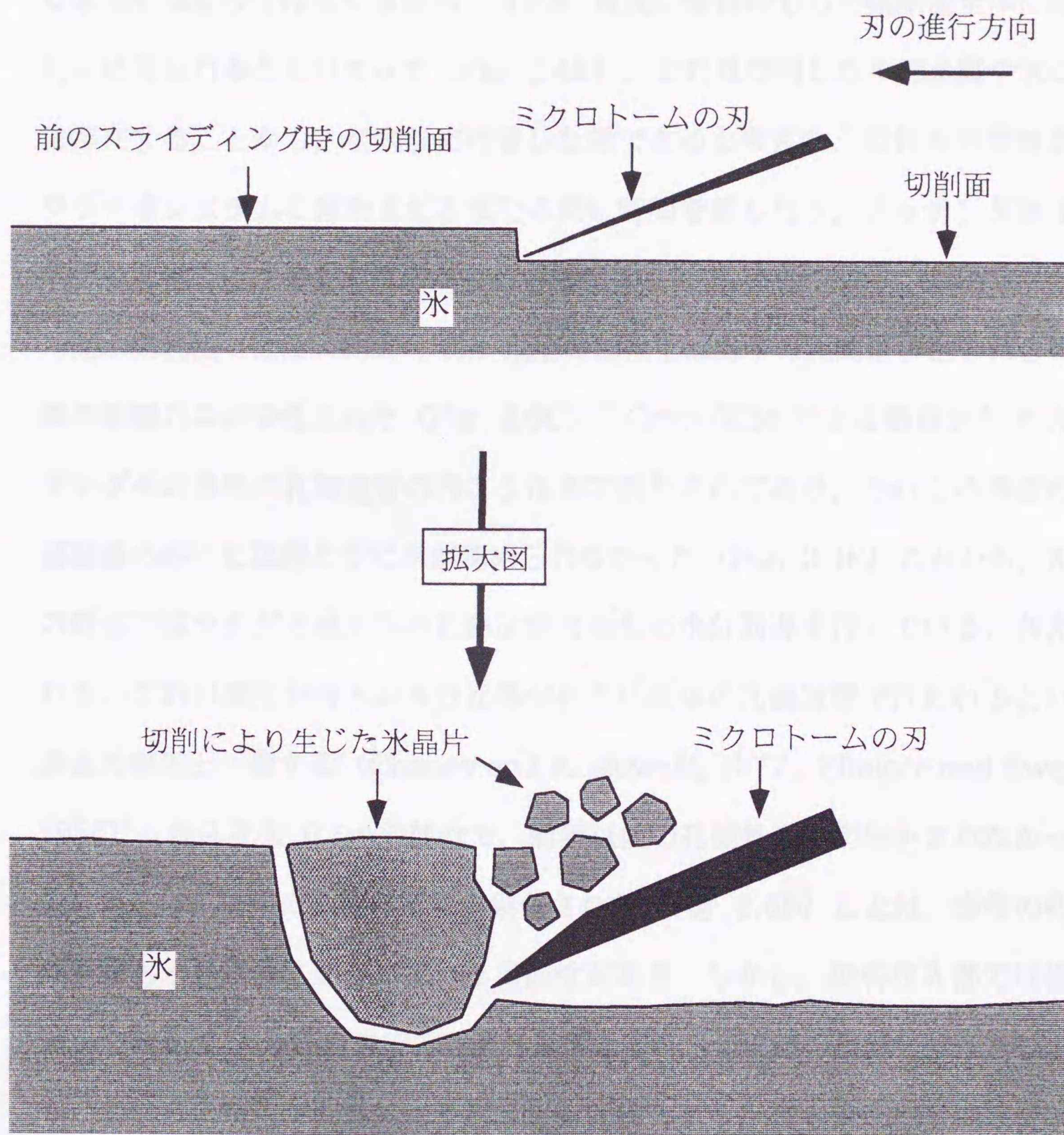


Fig. 2.7 氷を切削するときの状態.

込んで水滴状に見えることも考えられる。観察面上にはこのような比較的大きな氷晶片ばかりではなく直径約 $0.5\mu\text{m}$ 程度の粒状のものが観察面全体にほぼ均一に見られることがあった (Fig. 2.4B)。これは切削した木部組織や氷の上に存在することから、切削後に付着した霜であると考えた。試料を切削後からクライオシステムに移動させるまでの間に時間を要したり、エッチング処理が不十分な場合にこのような霜が生じると考えられる。

立木染色法では注入孔上 1.0m 以上の部位では当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織のみが染色された (Fig. 2.6C)。Cryo-SEM による観察から 8 月のヤチダモの当年の孔圏道管の内こうは水で満たされており、それらの周囲の木部繊維の多くには内こうに水が認められなかった (Fig. 2.4E) ことから、8 月の時点ではヤチダモは当年の孔圏道管でおもに水分通導を行っていると考えられる。これは環孔材樹木の水分通導がおもに当年の孔圏道管で行われるという過去の報告と一致する (Chaney and Kozlowski, 1977; Ellmore and Ewers, 1986)。注入孔上 0.5m の部位で、前年以前の孔圏外道管が染色されなかったのに対して、当年の孔圏外道管が染色された (Fig. 2.6B) ことは、当年の孔圏外道管も水分通導に関与している可能性がある。しかし、染料注入部では樹皮側から数えて 7 年輪目までの孔圏外道管とそれらの周囲の組織も染色されており、これらの染色が拡散により起きた可能性もある。立木染色法では道管以外にもそれらの周囲の組織が染色され、これらの組織が水分通導に関与している可能性を否定できない (宮田と佐伯, 1984)。木部における水分通導の部位を正確に観察するためには Cryo-SEM により木部の水分分布を観察し、加えて立木染色を行って確認する必要があると考える。

本章では Cryo-SEM を用いた木部水分分布の細胞単位での観察法をヤチダ

モを用いて検討した。試料採取時に蒸散に起因する水ポテンシャルの低下により道管に空気が引き込まれることを防ぐ手法の検討を行い、立木液体窒素凍結法による試料採取が立木状態の水分分布からの変化が最も少ない手法であることを明らかにした。また、木部の水ポテンシャルが大気圧に近い値の時には液体窒素凍結法による試料採取も可能であることを示した。また、木部の水分の観察を試料内で広範囲に行うためには、これまで佐野ら（1993）によって開発された凍結切削法が適していることを確認した。しかし、この手法を用いても観察時に氷晶の剥離や霜が付着する可能性があることを示し、試料を観察する際の問題点として検討した。加えて Cryo-SEM により観察された木部の水分と水分通導との関係を明らかにする手法として、立木染色法による観察を行い、木部における水分通導の部位の視覚化を検討した。その結果、立木染色法単独での観察では水分通導を行っている通水系を特定することはできないものの、Cryo-SEM 法と併用することにより樹木の水分通導の経路を明らかにすることができることを示した。

第3章 ヤチダモの木部水分分布の季節変化と水分通導

3.1 はじめに

広葉樹の樹幹の木部ではすべての通水系が水分通導機能を保持しているわけではない。立木染色法による観察から、数種の環孔材樹木では辺材の外層部に染料の上昇が報告されており (Greenidge, 1957b ; Kozlowski and Winget, 1963), アメリカトネリコではおもに当年の孔圏道管に染料が上昇したことが報告されている (Chaney and Kozlowski, 1977)。環孔材樹木ではおもに当年の孔圏道管で水分通導が行われると考えられている。また、樹木の水分通導の季節変化は透水性を測定することにより検討されているが、ヨーロッパヤチダモやガンベリナラの透水性を定期的に測定したところ、冬期と比較して春期に透水性が上昇したことが報告されており (Sperry et al., 1994 ; Hacke and Sauter, 1996a), 春期に孔圏道管が新たに形成されたことが透水性の上昇の理由として考えられている (Hacke and Sauter, 1996a)。環孔材樹木の当年の孔圏道管は、その年の冬期までには水分通導機能の障害を起こし、翌年の春期になってもその機能を回復することはなく、したがって形成された年にのみ水分通導機能をもつことになる。

環孔材樹木の通水系が水分通導機能障害を起こす時期についても透水性法により検討されている。ヨーロッパヤチダモ、ガンベリナラ、ペトラエナラ、プベセンスナラ、ロブルナラでは秋期から冬期にかけての一時期に気温が最初に零度を下回った後に透水性が急激に低下したことが報告されている (Chochard and Tyree, 1990 ; Chochard et al., 1992 ; Sperry and Sullivan, 1992 ; Sperry et al., 1994 ; Hacke and Sauter 1996a)。透水性のこのような低下は何らかの原因でキャビテーションが起こることによると考えられており (Sperry,

1993), その原因としてこれまで水ストレスと木部の凍結とが考えられている (Zimmermann, 1983 ; Tyree and Sperry, 1989). このような秋期から冬期にかけての透水性の低下は, 気温の零度以下へ低下する時期と対応していることから, 木部の凍結によりキャビテーションが起きて透水性が低下したと考えられている (Sperry et al., 1994).

冬期間に外気温が零度以下になる地域に生育する環孔材樹木では木部の凍結により道管のキャビテーションが急速に進行し, 結果として木部全体の透水性が低下することが考えられる. しかし, 透水性が低下した木部の道管でキャビテーションが起きているかどうかはこれまで顕微鏡を用いて確認されていない. また透水性が低下した木部においてすべての道管に水分通導機能障害が起きているのか, それとも一部の道管に水分通導機能障害が限定されるのかは明らかになっていない. 加えて, 水分通導機能障害が起きた道管では内こうが完全に空洞化しているのか, それとも水が存在しているのかについても明らかになっていない. 樹木の水分通導の季節変化については, これまで定量的に測定される場合が多く定性的な研究成果は乏しい. また, これまでおもに用いられてきた立木染色法だけでは水分通導を行っている木部の経路を正確に把握できないことは第2章で述べた.

そこで本章では, 環孔材樹木であるヤチダモのとくに樹皮側から数えて1, 2年輪目の水分分布を, 第2章で検討した試料採取および観察法にしたがいCryo-SEMを用いて調べ, 木部水分分布の季節変化を細胞単位で視覚化することを目的とした. 供試木としては15年生と3, 4年生のヤチダモを用い, その違いについても検討した. また, Cryo-SEMにより観察された細胞内こうの水が樹木が水分通導を行うときに移動する水なのかどうかを確認するために, 15年生ヤチダモを用いて, 第2章で検討した立木染色法により観察した. さ

らに、Cryo-SEM で観察される当年の木部繊維の内この水分が原形質であるかどうかを判断するためメチレンブルー・アズール A と塩基性フクシンで二重染色した試料を用いて光学顕微鏡で観察した。

3.2 実験方法

3.2.1 供試木

北海道大学農学部附属中川地方演習林 204 林班に植栽されていた樹高約 8m、胸高直径約 8cm の 15 年生のヤチダモおよび北海道大学農学部附属演習林実験苗畑（札幌）に植栽されていた樹高約 2m、地上高 80cm の部位での直径約 2cm の 3, 4 年生のヤチダモを供試木として用いた。

3.2.2 Cryo-SEM 法の試料採取と観察試料の作製

15 年生のヤチダモを供試木として、1994 年 5 月から 1995 年 2 月まで 2～8 週間間隔で 2 本ずつ採取した。試料の採取および作製法は第 2 章の 2.2.2 に準じた。本章では当年および前年の木部の観察を行った。おもに木口面で観察を行ったが、必要に応じて板目面での観察も行った。6 月から 11 月までの間は第 2 章に基づく立木液体窒素凍結法を用いて試料を採取した。5 月には第 2 章に基づく低温窒凍結法を、翌年の 2 月には第 2 章に基づく液体窒素凍結法を用いて試料を採取した。

また、3, 4 年生のヤチダモを試料として、1996 年 3 月から 12 月までと 1997 年の 6 月から 11 月まで 2～8 週間間隔で 2 本ずつ採取した。試料の採取および作製法は第 2 章の 2.2.2 に準じ、すべての試料を立木液体窒素凍結法を用いて採取した。

3.2.3 立木染色法による染料注入と試料採取

15年生のヤチダモを試料として、1994年5月から11月まで2~4週間間隔で2本ずつ採取した。試料の採取および作製法は第2章の2.2.3に準じた。染料の注入を1時間または2時間それぞれ1本の供試木に行い、染色部位を含む樹幹を採取した。

3.2.4 光学顕微鏡法

15年生のヤチダモを試料とし、1994年5月から1995年2月までCryo-SEMによる観察に用いた供試木の胸高部よりブロックを切り出し、剃刀により小片にした試料を4%グルタルアルデヒドにより1昼夜固定した。ついで後固定として1%四酸化オスミウムにより1時間固定した後、常法に従い洗浄、脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。

包埋した試料からウルトラミクロトーム (EM-Ultracut J; 日本電子) を用いて1 μ m厚の切片を作製し、0.15%メチレンブルー・アズールA水溶液により65℃で20分間染色した後、室温で0.05%塩基性フクシン水溶液により5分間染色して二重染色を行い (Humphrey and Pittman, 1974; Schneider, 1981), 光学顕微鏡 (BH-2; オリンパス光学工業) で試料を観察した。

3.2.5 気温データ

15年生ヤチダモに関しては、試料を採取した地点より約10km離れたアメダス観測地点・音威子府において測定・記録された日最低気温と日最高気温のデータを利用した (札幌管区気象台, 1994, 1995)。また、3, 4年生ヤチダモに関しては、試料を採取した地点より約500m離れた、北海道大学農学部附属農場において常時観測されている日最低気温の記録を利用した (北海道大学農

学部, 1996, 1997).

3.3 結果

3.3.1 15 年生ヤチダモの木部水分分布の季節変化

15 年生ヤチダモの樹幹の当年および前年の木部における水分分布の季節変化を Cryo-SEM により観察した.

5 月中旬, 供試木はまだ開葉していなかったが, 当年木部の形成が始まっていた (Fig. 3.1A, B). 分化帯では拡大中の孔圏道管が認められた (Fig. 3.1B, v). 当年の分化中木部のすべての細胞内こうに原形質がみられた. 前年の孔圏外道管の内こうは水で満たされていた (Fig. 3.1A, 小矢印). 前年の多くの木部繊維の内こうには水が見られなかった. また観察試料では分化帯が壊れていた (Fig. 3.1 A, 大矢印) が, これは採取された試料を低温室凍結法により凍結固定したことによる氷晶析出の結果生じたものである (第 2 章).

5 月下旬になると供試木の冬芽が開き始めていた. 孔圏道管の分化がすすみ, 径の拡大がほぼ完了したと思われる道管も見られた (Fig. 3.1C, v). 当年木部のすべての細胞内こうに水もしくは原形質が観察された. Fig. 3.1C において, 道管の内こうに一部空隙が見られる (矢印) が, これは採取された試料を低温室凍結法により凍結固定したことにより道管外に氷晶析出が起きたために生じたものである (第 2 章).

6 月上旬では供試木は開葉していた. 木部形成が進んでおり, 形成層帯 (Fig. 3.1D, ca) 付近には形成中の道管が見られた (Fig. 3.1D, アステリスク). 形成層帯付近の道管壁は, 年輪イニシャル部に近い分化の進んだ孔圏道管の細胞壁 (Fig. 3.1D, 矢印) よりも薄壁であることがわかる. 当年木部のすべての細胞内こうに水もしくは原形質が存在していた.

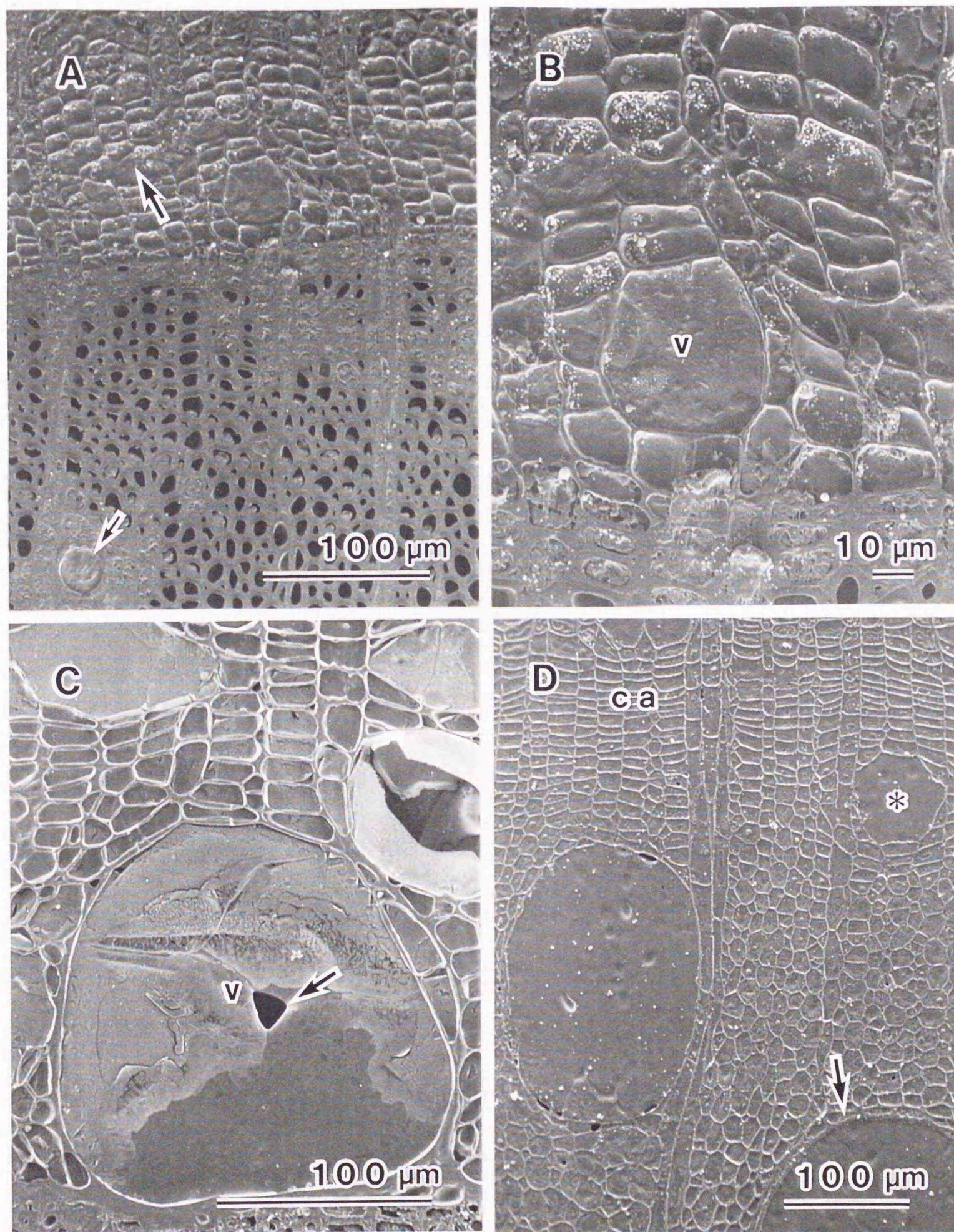


Fig. 3.1 15 年生ヤチダモの Cryo-SEM 写真. 木口面. A, 5 月中旬の当年および前年の木部. 大矢印は分化帯, 小矢印は孔圏外道管を示す. B, 5 月中旬の形成層帯付近. v は孔圏道管を示す. C, 5 月下旬の当年木部. v は道管, 矢印は空隙を示す. D, 6 月上旬の当年木部. ca は形成層帯, アステリスクは形成中の道管, 矢印は道管壁を示す.

7 月に入ると孔圏外部の木部形成が進行しており，当年木部のすべての細胞内こうに水もしくは原形質がみられた．Fig. 3.2A は板目面での当年の孔圏部を示している．孔圏道管（v）内こうは水で満たされておりエッチングの程度はほぼ均一に見える．これに対して，木部繊維（f）では内こうの水の表面が孔圏道管の内こうの水とは異なり，場所によってエッチングの程度に差があるように見える．

8 月になると多くの孔圏道管の内こうは水で満たされていた．当年の孔圏部の多くの木部繊維の内こうにほとんど水が存在していなかったが，内こうが水で満たされている木部繊維も見られた．Fig. 3.2B は木口面での当年孔圏部を示している．内こうに水が見られない木部繊維（小矢印）と内こうが水で満たされている木部繊維（大矢印）が見られる．孔圏道管（v）の内こうは水で満たされている．

9 月になると当年木部の大部分の木部繊維の内こうに水が存在していなかった．形成層帯付近の木部繊維の内こうに水もしくは原形質が見られるのみとなった．また，この時期の形成層帯（Fig. 3.2C, ca）の幅は狭く木部の形成はほとんど終了していた．年輪の後半部の木部繊維の内こうには水または原形質が見られた（Fig. 3.2C, 矢印）．ターミナル柔細胞の内こうには原形質が見られた（Fig. 3.2D, 矢印）．当年の孔圏外道管の内こうは水で満たされていた（Fig. 3.2D, v）．当年木部の多くの孔圏道管の内こうは水で満たされていた．

10 月になると供試木はほとんど落葉していた．当年のほとんどの木部繊維の内こうには水が見られなかった．一方，当年のすべての孔圏道管は水で満たされていた（Fig. 3.3A）．Fig. 3.3B は当年の孔圏部の一部を示しているが，孔圏道管の内こうに水が充満し，それらの周囲の木部繊維（f）の内こうにはほとんど水が存在していないことがわかる．また，板目面での当年の孔圏部の観察に

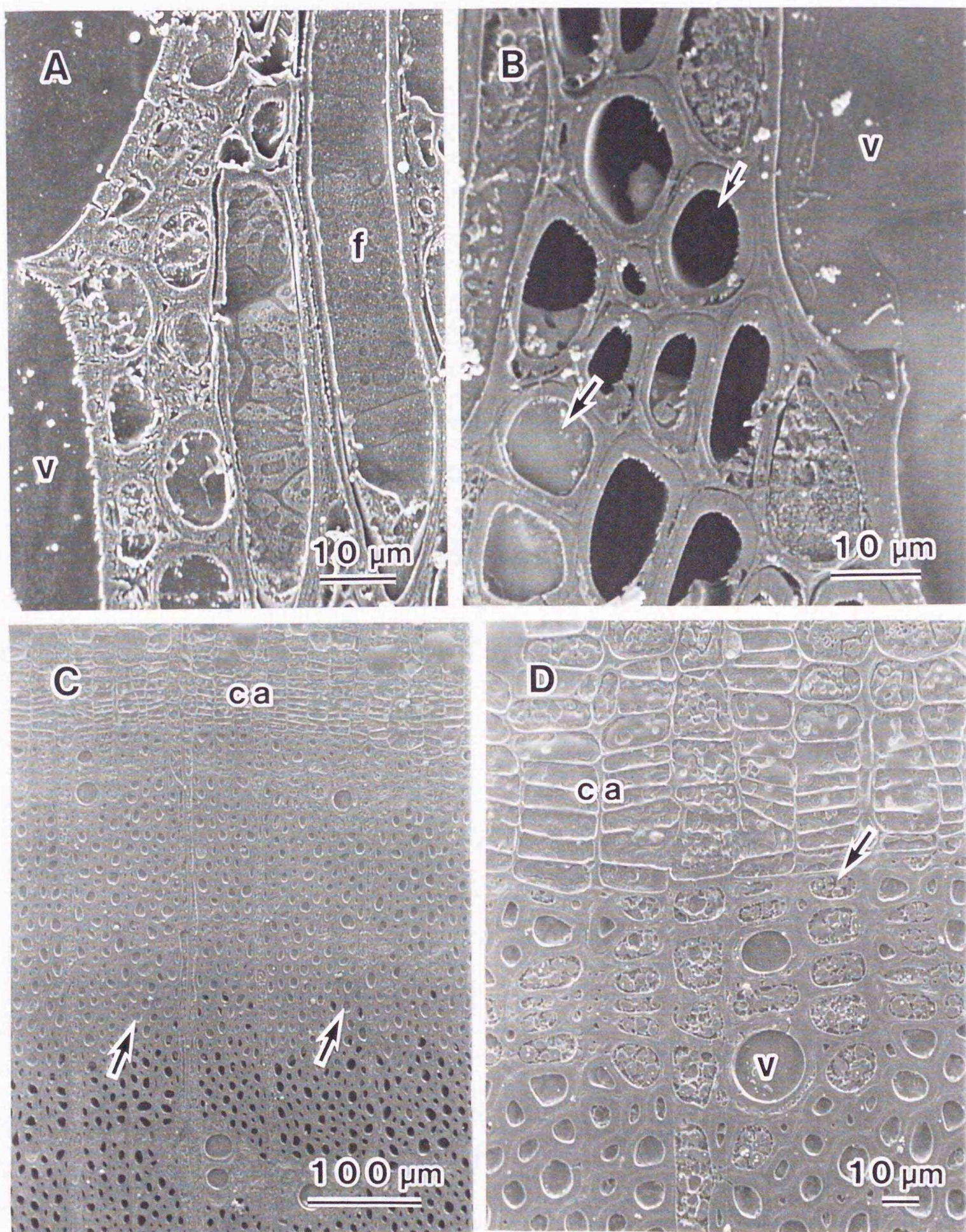


Fig. 3.2 15年生ヤチダモの Cryo-SEM 写真. A, 7月の当年の孔圏部. 板目面. v は道管, f は木部繊維を示す. B, 8月の当年の孔圏部. 木口面. 大矢印は水で満たされている木部繊維, 小矢印は水が見られない木部繊維, v は道管を示す. C, 9月の当年の孔圏外部と形成層帯 (ca). 木口面. 矢印は水もしくは原形質で満たされている木部繊維を示す. D, Cの一部の拡大. ca は形成層帯, v は道管, 矢印はターミナル柔細胞を示す.

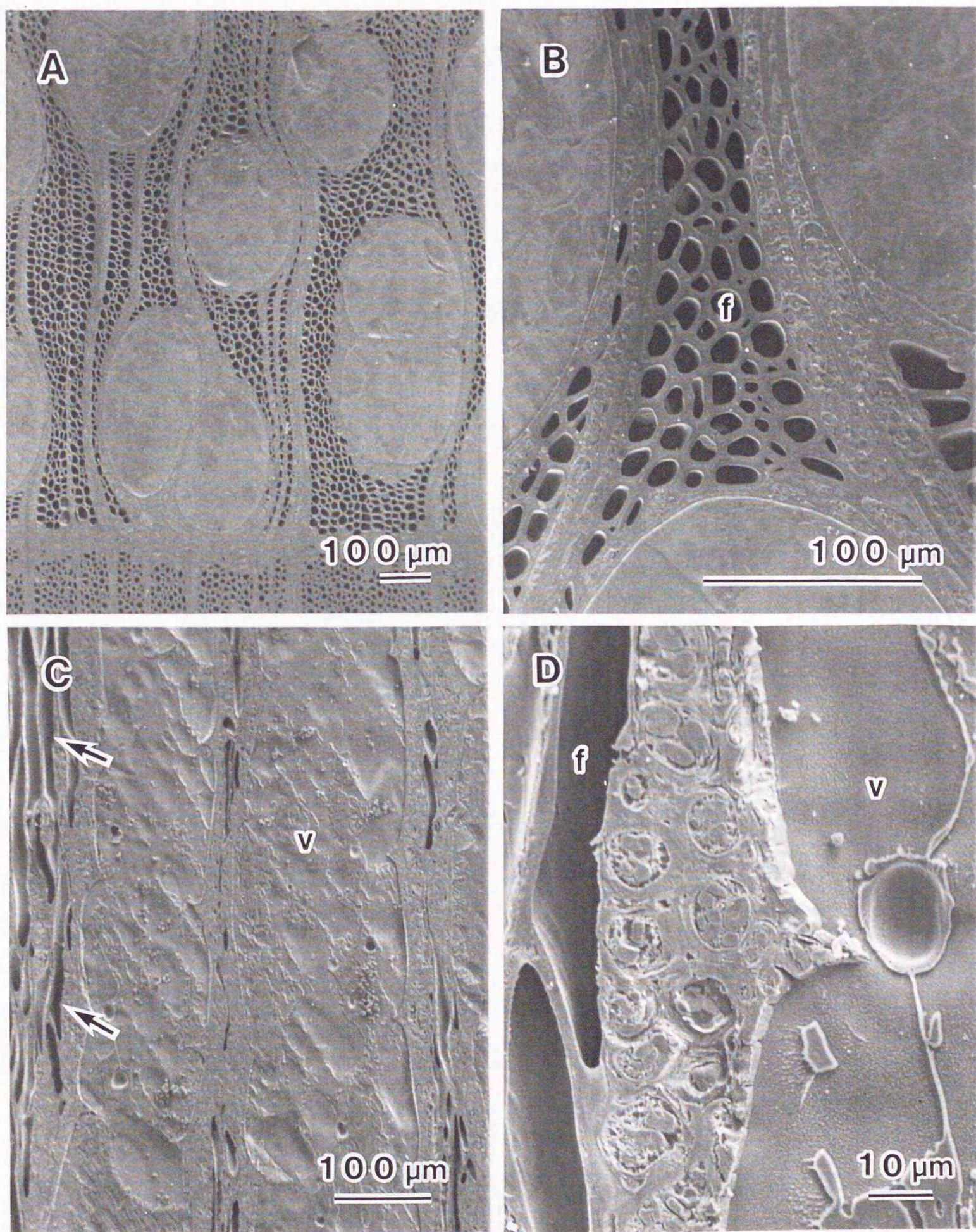


Fig. 3.3 15 年生ヤチダモの 10 月の Cryo-SEM 写真. A, 当年の孔圈部. 木口面. B, 当年の孔圈部の一部. 木口面. f は木部繊維を示す. C, 当年の孔圈部. 板目面. v は道管, 矢印は木部繊維を示す. D, 当年の孔圈部の一部. 板目面. f は木部繊維, v は道管を示す.

においても同様に孔圏道管(Fig. 3.3C, v)の内こうが水で満たされているのに対して、それらの周囲の木部繊維にはほとんど水が存在していなかった(Fig. 3.3C, 矢印)。Fig. 3.3D は Fig. 3.3C の一部の拡大である。道管(v)内こうの水の観察面が周囲の放射柔細胞内こうの原形質の観察面と比較して深くエッチングされ、その表面が比較的平滑であるように見える。また木部繊維(f)の内こうに水は見られない。

11月の時点では供試木は完全に落葉していた。10月まで水が観察された当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水が観察されず、道管の内こうの一部に水が見られるだけであった(Fig. 3.4A, 大矢印)。これに対して、当年の孔圏部の木部繊維の細胞内こうが水で満たされていた(Fig. 3.4A, 小矢印)。しかし、孔圏部の木部繊維においてもすべての木部繊維の内こうに水が存在していたのではなく、孔圏道管周囲の木部繊維の内こうに水が存在していた(Fig. 3.4B, 矢印)。板目面での当年の孔圏部の観察からも、孔圏道管の内こうにはほとんど水が存在しておらず、それらの周囲の木部繊維に水が存在していることがわかった(Fig. 3.4C, 矢印)。また、水が存在していない道管の内こうの表面に、膜状の付着物が存在しているように見えることもあった(Fig. 3.4C, アステリスク)。Fig. 3.4D は Fig. 3.4C の一部の拡大である。内こうに水が見られない孔圏道管(v)の一部、放射柔細胞(矢印)、内こうが水で満たされている木部繊維(f)が観察される。放射柔細胞内こうの原形質には、切断面とほぼ同じ高さの部分とエッチングにより深く窪んだ部分があるのがわかる。

2月になると、前年の孔圏道管の内こうには水が存在していなかった。前年の孔圏部の木部繊維の内こうにもほとんど水が観察されなかった(Fig. 3.5A)。一方、前年の孔圏外道管の内こうは水で満たされていた(Fig. 3.5B, v)。観察期間を通じて樹皮側から数えて1, 2年輪目の多くの孔圏外道管の内こうは水

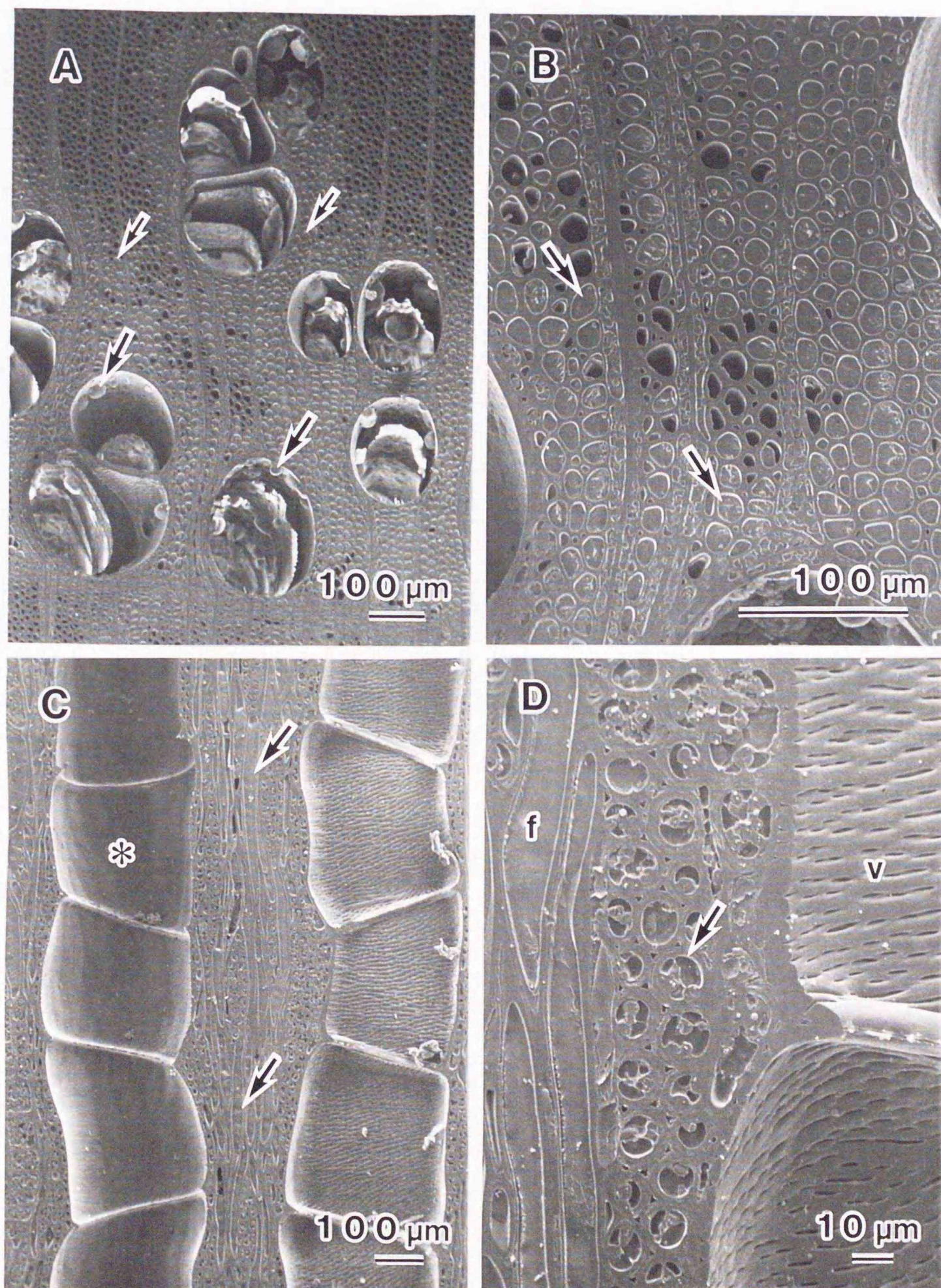


Fig. 3.4 15年生ヤチダモの11月のCryo-SEM写真. A, 当年の孔圏部. 木口面. 大矢印は道管内この水, 小矢印は水で満たされている木部繊維を示す. B, A の一部の拡大. 矢印は水で満たされている木部繊維を示す. C, 当年の孔圏部. 板目面. アステリスクは, 付着物のある道管, 矢印は水で満たされている木部繊維を示す. D, C の一部の拡大. 矢印は放射柔細胞, f は木部繊維, v は道管を示す.

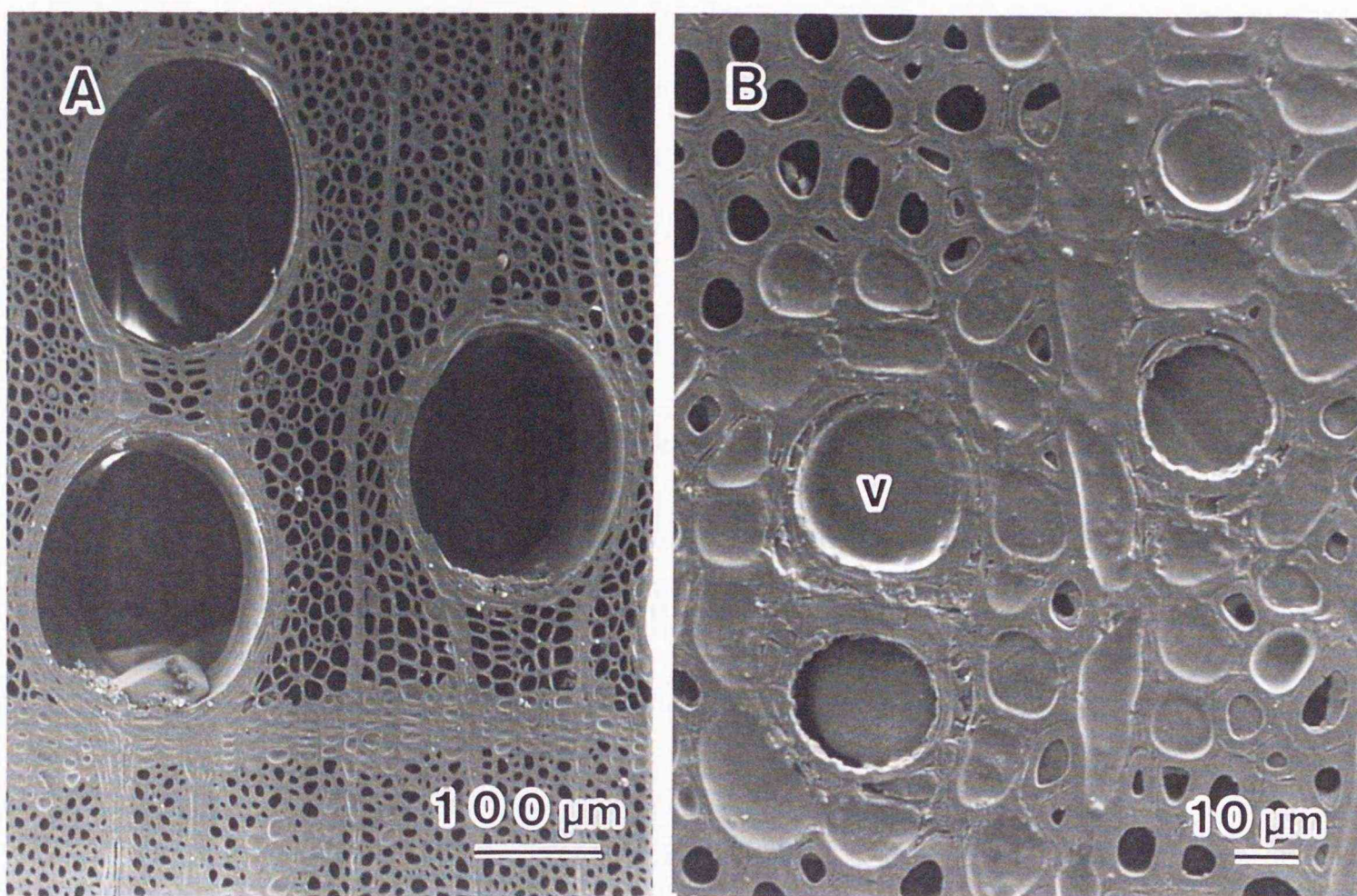


Fig. 3.5 15 年生ヤチダモの 2 月の Cryo-SEM 写真. 木口面. A, 前年の孔
 圈部. B, 前年の孔圈外部. v は道管を示す.

で満たされていた。

以上の結果の概略図を Fig. 3.6 に示す。

3.3.2 3, 4 年生ヤチダモの木部水分分布の季節変化

3, 4 年生ヤチダモにおける木部水分分布の季節変化を Cryo-SEM により観察した。3, 4 年生ヤチダモの木部水分分布の季節変化の結果は 15 年生ヤチダモの木部水分分布の季節変化とほぼ同様であったが、当年の孔圏道管の内こうから水の消失が観察される時期に違いが認められた。ここでは 1996 年の成長期間中の観察と、1996 年および 1997 年の当年の孔圏道管の内こうから水が消失する時期の観察結果について述べる。

1996 年 3 月、前年の孔圏外道管の内こうに水が充満しているのが観察された (Fig. 3.7A, v)。当年木部の形成はまだ始まっていなかった。5 月上旬では冬芽が膨らんでいた。まだ当年の木部の形成が見られなかった (Fig. 3.7B)。5 月下旬になると冬芽が開きかけていた。当年木部の形成が始まっており、木部繊維や放射柔細胞が分化中であった (Fig. 3.7C)。径の拡大がほぼ完了したと思われる孔圏道管も見られた (Fig. 3.7C, アステリスク)。7 月に入ると孔圏外部の形成が進行し、孔圏道管と比較して小径の孔圏外道管が見られた (Fig. 3.7D, 大矢印)。また、当年の孔圏部付近の木部繊維の内こうには水が認められないものもあった (Fig. 3.7D, 小矢印)。

10 月下旬になると当年木部の多くの木部繊維の内こうには水が見られなかったが、当年木部のほとんどの孔圏道管の内こうは水で満たされていた (Fig. 3.8A)。さらに、11 月中旬でも同様に当年のほとんどの孔圏道管の内こうは水で満たされており、孔圏道管の周囲の木部繊維には水が認められなかった (Fig. 3.8B)。軸方向柔細胞 (Fig. 3.8B, 小矢印) と放射柔細胞 (Fig. 3.8B, 大矢印)

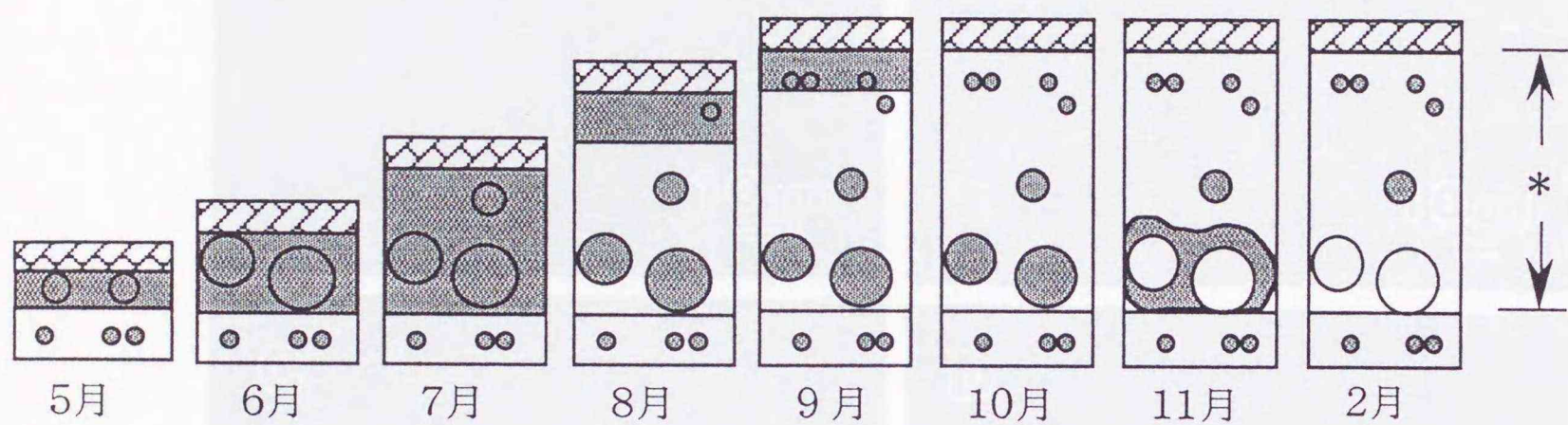


Fig. 3.6 15年生ヤチダモにおける当年木部の水分分布の季節変化.

- , 水分が存在した木部繊維.
- , 水分が存在しなかった木部繊維.
- , 水分が存在した道管.
- , 水分が存在しなかった道管.
- *, 当年木部.

Fig. 3.7 3, 4年生ヤチダモの1996年のCryo-SEM写真. 本口面. A, 3月の前年の孔部外縁. * は道管を示す. B, 5月上旬の形成層帯 (ca) 付近. C, 5月下旬の形成層帯と当年木部. アステリスタは道管を示す. D, 7月の当年木部. 大矢印は孔部外道管, 小矢印は水が見られない木部組織を示す.

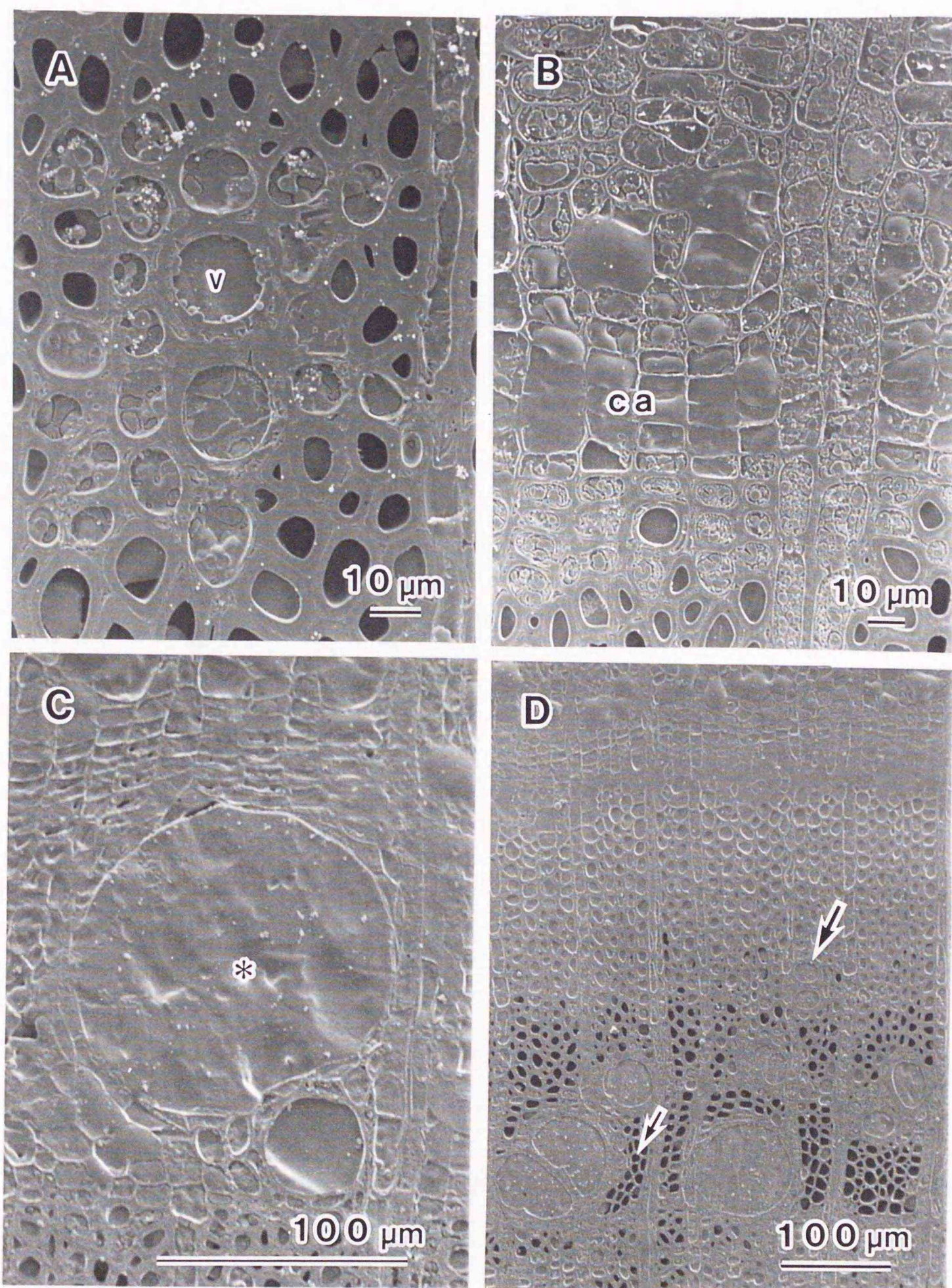


Fig. 3.7 3, 4年生ヤチダモの1996年のCryo-SEM写真. 木口面. A, 3月の前年の孔圏外部. v は道管を示す. B, 5月上旬の形成層帯(ca)付近. C, 5月下旬の形成層帯と当年木部. アステリスクは道管を示す. D, 7月の当年木部. 大矢印は孔圏外道管, 小矢印は水が見られない木部繊維を示す.

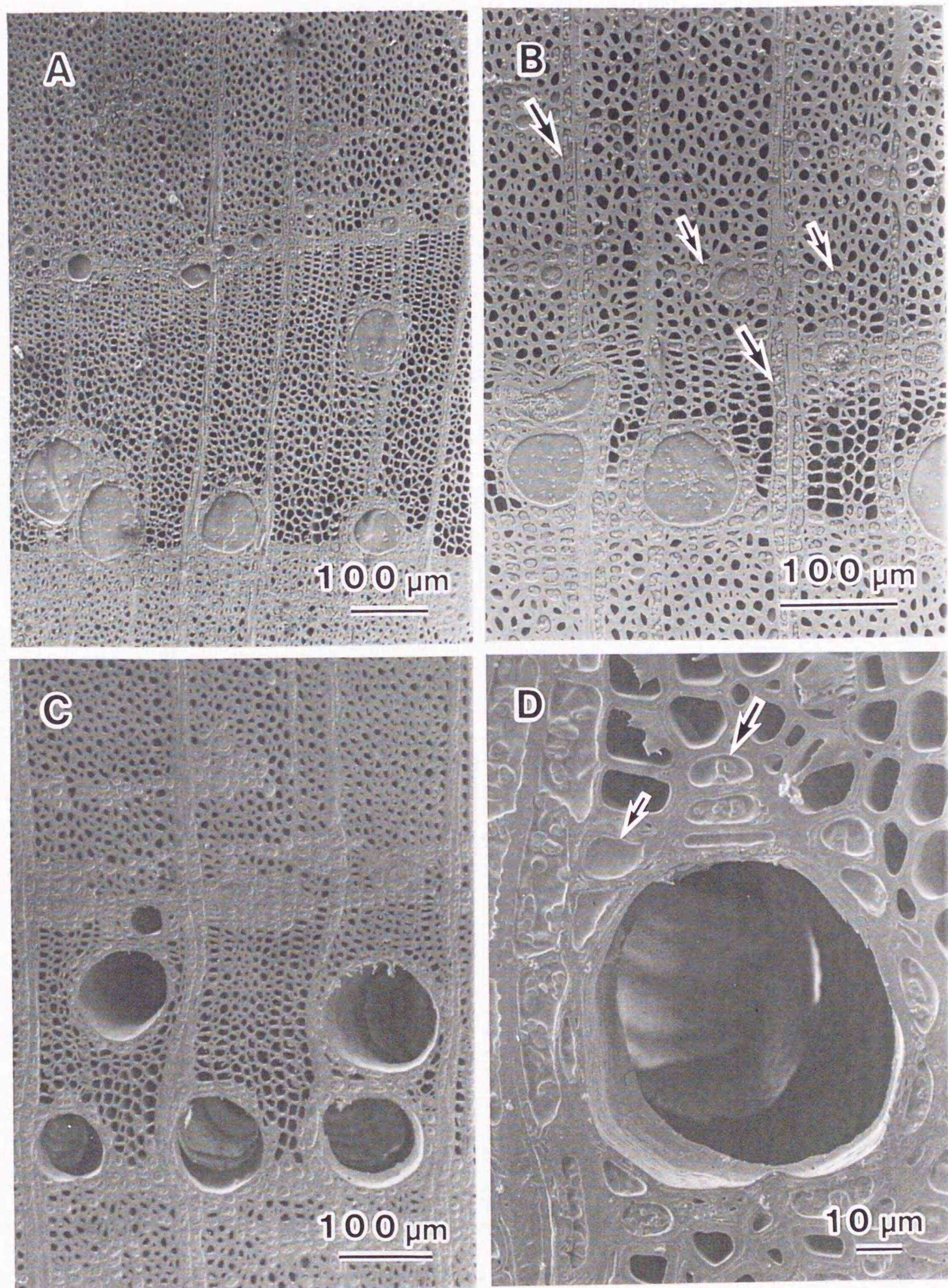


Fig. 3.8 3, 4年生ヤチダモの1996年のCryo-SEM写真. 木口面. A, 10月下旬の当年の孔圈部. B, 11月中旬の当年の孔圈部. 小矢印は軸方向柔細胞, 大矢印は放射柔細胞を示す. C, 12月中旬の当年の孔圈部. D, Cの一部の拡大. 小矢印は水で満たされている木部繊維. 大矢印は軸方向柔細胞を示す.

の内こうには原形質が見られた。これに対して12月上旬と12月中旬には当年のすべての孔圏道管の内こうにはほとんど水が存在しなかった (Fig. 3.8C)。当年の孔圏部の多くの木部繊維の内こうにも水が観察されなかった。Fig. 3.8Dは12月中旬の当年の孔圏部の一部を示す。孔圏道管の内こうには水が認められない。放射柔細胞と軸方向柔細胞 (大矢印) の内こうには原形質が見られる。道管周囲の一部の木部繊維 (小矢印) の内こうは水で満たされている。

1997年の観察においては11月上旬まで、当年のほとんどの孔圏道管の内こうが水で満たされていた (Fig. 3.9A)。板目面での当年孔圏部の観察からも道管の内こうが水で充満していることが確認された (Fig. 3.9B)。当年の孔圏部の多くの木部繊維の内こうには水がほとんど認められなかったが、いくつかの木部繊維の内こうには水が観察された (Fig. 3.9B, 矢印)。11月下旬になるとすべての当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水が認められなかった (Fig. 3.9C)。当年の孔圏部の板目面観察でも、道管の内こうにはほとんど水が存在していなかった (Fig. 3.9D)。また、当年の孔圏部の多くの木部繊維の内こうには水が認められなかったが、いくつかの木部繊維の内こうには水が存在していた (Fig. 3.9D, 矢印)。

3.3.3 15年生ヤチダモの染料上昇部位の季節変化

立木染色を施した供試木の樹幹部を、染料注入孔から樹軸方向に0.5mごとにそれぞれ観察し、樹幹内における染色が観察された部位の上限を特定した。

Cryo-SEMによる観察からは5月中旬には当年の木部の形成がはじまっており、同下旬になると径の拡大がほぼ完了したと思われる孔圏道管も認められた (第3章の3.3.1) が、5月に採取した供試木において注入孔上0.5m以上の部位の木部では染色は観察されなかった。染料注入部では前年以前の辺材のいく

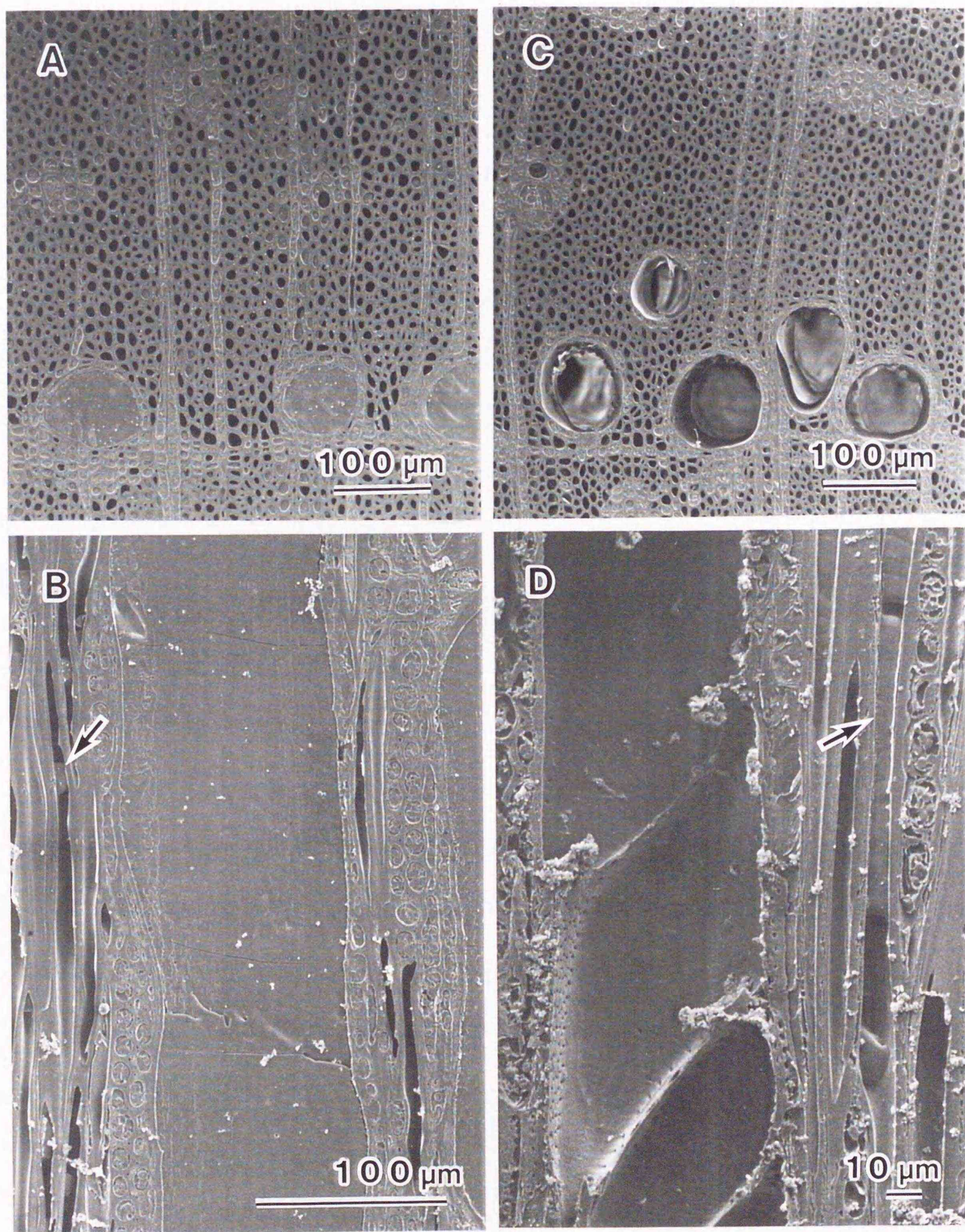


Fig. 3.9 3, 4 年生ヤチダモの 1997 年の Cryo-SEM 写真. A, 11 月上旬の当年の孔圏部. 木口面. B, 11 月上旬の当年の孔圏部. 板目面. 矢印は木部繊維内この水を示す. C, 11 月下旬の当年の孔圏部. 木口面. D, 11 月下旬の当年の孔圏部. 板目面. 矢印は木部繊維内この水を示す.

つかの道管とそれらの周囲の組織が染色されているのが観察された。とくに樹皮側から数えて 2, 3 年輪目の多くの孔圏外道管とそれらの周囲の組織が強く染色されているのが観察された (Fig. 3.10A, 矢印)。これに対して, 染料注入部の辺材の内層部に染色は見られなかった。心材では孔圏道管と孔圏外道管の一部とそれらの周囲の組織のみが染色されているのが観察された (Fig. 3.10B, 矢印)。注入孔上 0.5m の部位では辺材外層部 (Fig. 3.10C) においても心材においても染色を観察することはできなかった。

6 月上旬になると孔圏部が形成され孔圏道管が観察された。当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織に染料の上昇が見られた。注入孔上 0.5m の部位では当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織が染色されていた (Fig. 3.10D)。2 時間染料を注入した供試木で注入孔上 1.0m の部位まで当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織に染色が観察された。

6 月下旬になると孔圏部の形成がさらに進んでいた。2 時間染料を注入した供試木で注入孔上 4.0m の部位まで当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織に染色が観察された。 (Fig. 3.10E)。しかし, 染料注入部では当年の大部分の組織が染色されていたのに対して, 染料注入孔上 4.0m の部位ではいくつかの孔圏道管とそれらの周囲の組織が染色されているだけであり, 形成層帯付近の多くの孔圏道管 (Fig. 3.10E, 矢印) とそれらの周囲の組織は染色されていなかった。染料注入部の前年以前の木部では, 5 月と同じように樹皮側から数えて 2, 3 年輪目の多くの孔圏外道管とそれらの周囲の組織が強く染色され, そのほかにはいくつかの孔圏道管とそれらの周囲の組織が染色されているだけであった。

7 月になると孔圏外部の形成が進んでおり, 染料注入部では当年の孔圏外道管の一部を除く当年の道管と, 前年以前の木部の孔圏外道管がおもに染色されていた。しかし, 注入孔上 0.5m の部位では当年の孔圏外道管に染色は観察さ

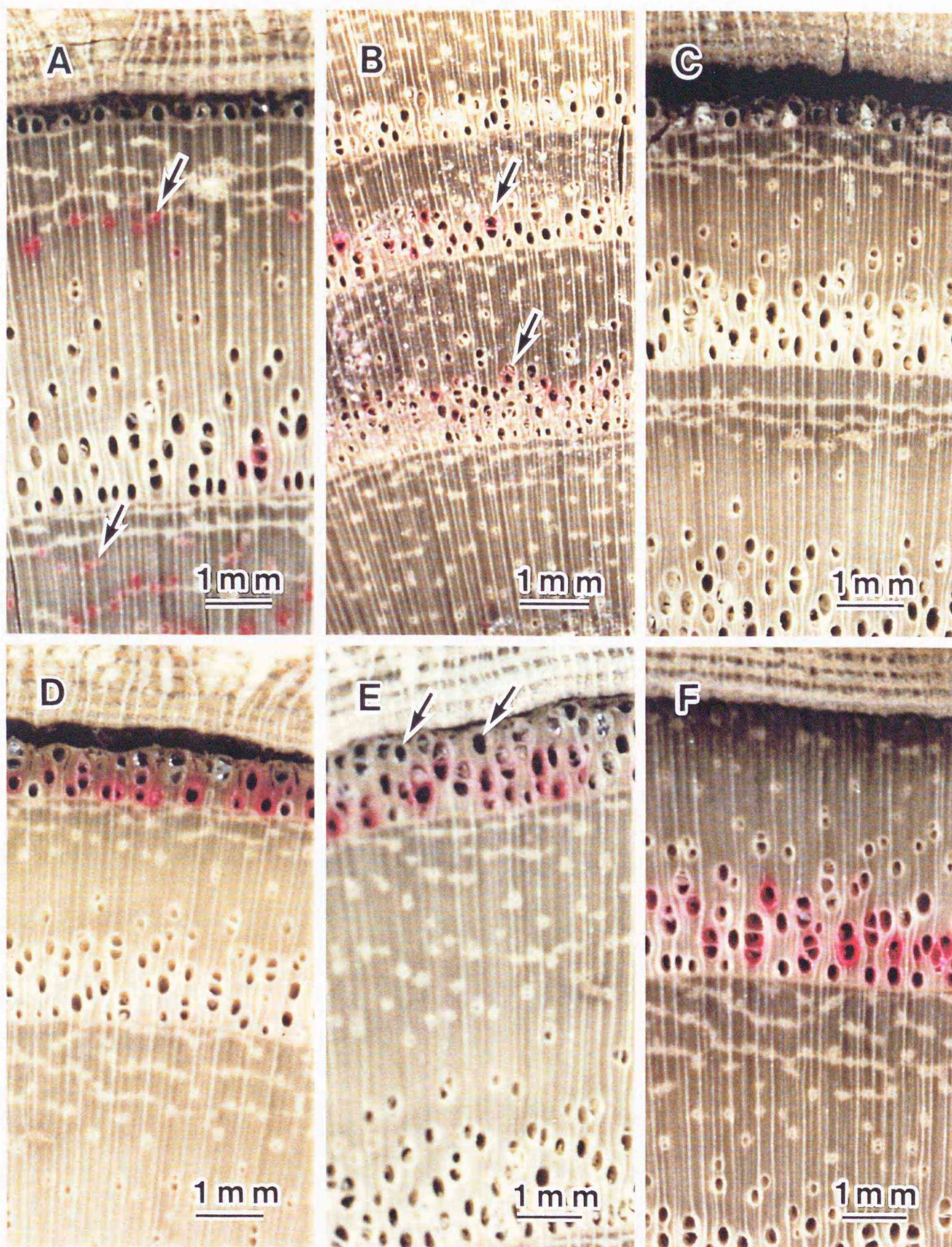


Fig. 3.10 15 年生ヤチダモの立木染色写真. 木口面. A, 5 月下旬の辺材外層部. 染料注入部. 矢印は染色されている道管を示す. B, 5 月下旬の心材. 染料注入部. 矢印は染色されている道管を示す. C, 5 月下旬の辺材外層部. 注入孔上 0.5m. D, 6 月上旬の辺材外層部. 注入孔上 0.5m. E, 6 月下旬の辺材外層部. 注入孔上 4.0m. 矢印は染色されていない道管を示す. F, 7 月の辺材外層部. 注入孔上 0.5m.

れず、当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織のみに染色が観察された (Fig. 3.10F). 当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織には染料注入 2 時間の試料で注入孔上 2.5m の部位まで染色が観察された (Fig. 3.11A). しかし、この部位においては染色されていた道管 (矢印) の数は染料注入部や注入孔上 0.5m に比べ減少し、また染色の程度も低下しているのが観察された。

8 月においては当年の孔圏および孔圏外の道管とそれらの周囲の組織に注入孔上 0.5m 以上の部位での染色が観察された。しかし、当年の孔圏外道管とそれらの周囲の組織に染色が観察されたのは注入孔上 0.5m までであり、注入孔上 1.0m (Fig. 3.11B) 以上の部位では当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織のみに染色が観察され、孔圏外道管には染色は観察されなかった。2 時間染料を注入した供試木で注入孔上 4.0m の部位まで当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織に染色が観察された。

9 月になると、注入孔上 0.5m 以上の部位で染色が観察されたのは当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織のみであり、注入孔上 0.5m の部位においても当年孔圏外道管に染色は観察されなかった (Fig. 3.11C). 当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織は染料注入 2 時間の供試木で注入孔上 1.5m の部位まで染色されているのが観察された。しかし、この部位においては染色された道管数は少なく、また染色の程度も低下していた。10 月においても注入孔上 0.5m 以上の部位では当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織のみに染色が観察された。染料注入 2 時間の供試木において、当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織に注入孔上 1.5m の部位まで染色が観察された (Fig. 3.11D). 11 月には、すべての木部において注入孔上 0.5m 以上の部位での染色は観察されなかった。染料注入部においても木部全体にほとんど染色がみられなかった。

本研究では注入孔上 0.5m 以上の部位の木部での染色は 6 月上旬から 10 月

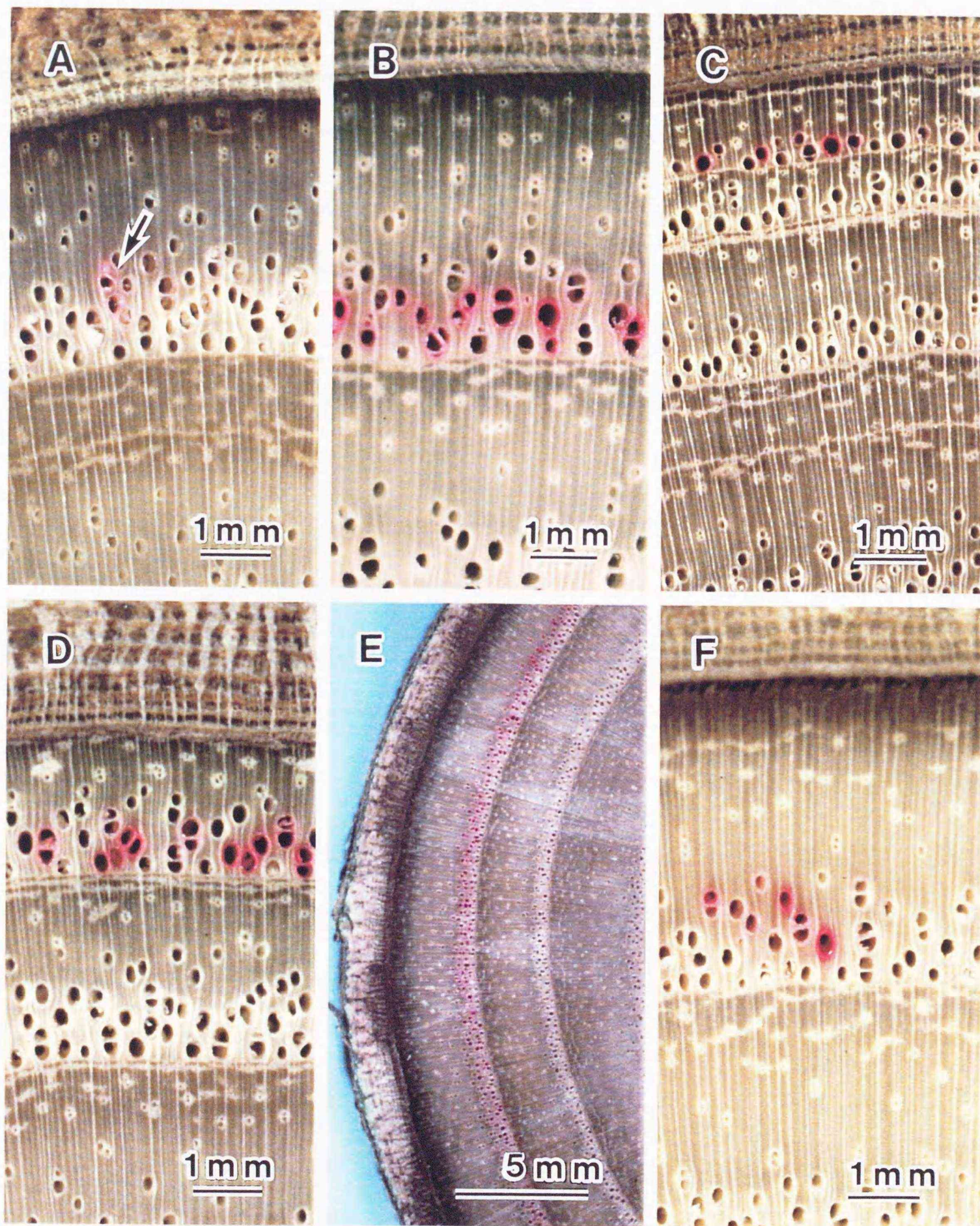


Fig. 3.11 15 年生ヤチダモの辺材外層部の立木染色写真. 木口面. A, 7 月. 注入孔上 2.5m. 矢印は染色された道管を示す. B, 8 月. 注入孔上 1.0m. C, 9 月. 注入孔上 0.5m. D, 10 月. 注入孔上 1.5m. E, 8 月の木部. 注入孔上 3.0m. F, 8 月. 注入孔下 0.5m.

まで観察された。この期間中、当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織に染色が観察された部位の上限は染料注入時期により異なり、染色が観察された部位の上限の最大は染料注入2時間の供試木において6月下旬と8月での注入孔上4.0mであった。観察期間を通じて、注入孔上1.0m以上の部位に染色が観察されたのは当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織のみであった。染料注入部より樹軸方向上部の木部に染色が観察された供試木では、観察部位が上部になるにしたがって木部の染色領域が接線方向に広がる傾向が見られた。Fig. 3.11Eは8月の注入孔上3.0mの部位のものであるが、染料注入孔の幅(8mm)と比較して接線方向に染色領域がかなり広がっていることがわかる。

一方、染料注入孔下0.5mの部位では6月から10月にかけて当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織が一部染色されているのが観察された。Fig. 3.11Fは8月の注入孔下0.5mの部位のものであり、当年の道管が染色されていることがわかる。

注入孔上0.5mの部位での木部の染色の季節変化の概略図をFig. 3.12にまとめる。また、染料注入を2時間行った供試木における木部に染色が観察された部位の上限の季節変化をFig. 3.13に示す。

3.3.4 15年生ヤチダモの光学顕微鏡観察

Cryo-SEMによる観察において成長期間中の当年の木部繊維の内こうに見られた水分が原形質かどうかを判断するため、メチレンブルー・アズールA-塩基性フクシンの二重染色を行い光学顕微鏡で観察した。この染色法ではセルロースは赤く染まり、核や細胞質は青く染色される(Humphrey and Pittman, 1974; Schneider, 1981)。以下に、Cryo-SEMによる観察において当年の孔圏部の多くの木部繊維の内こうに水が認められず、孔圏外部の木部繊維の内こ

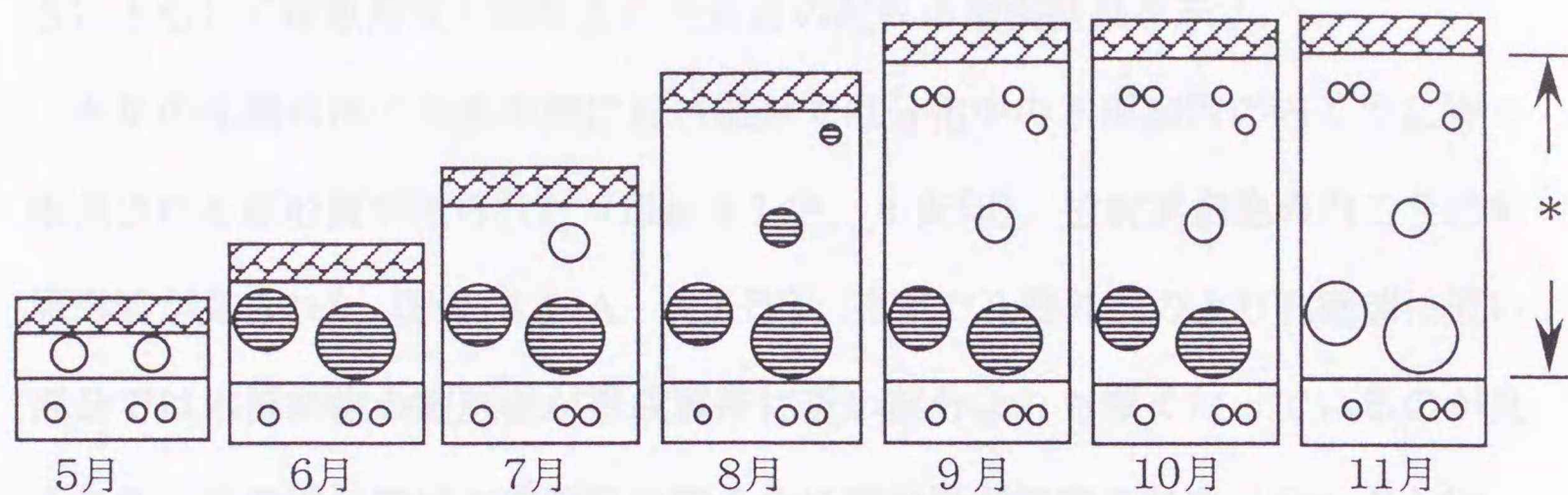


Fig. 3.12 立木染色によるヤチダモの染色部位の季節変化 (注入孔上0.5m).

●, 染色されていた道管. ○, 染色されていなかった道管.

▨, 師部. □, 木部繊維. *, 当年木部.

注, いずれの観察時にも道管周囲の組織にも染色が見られた.

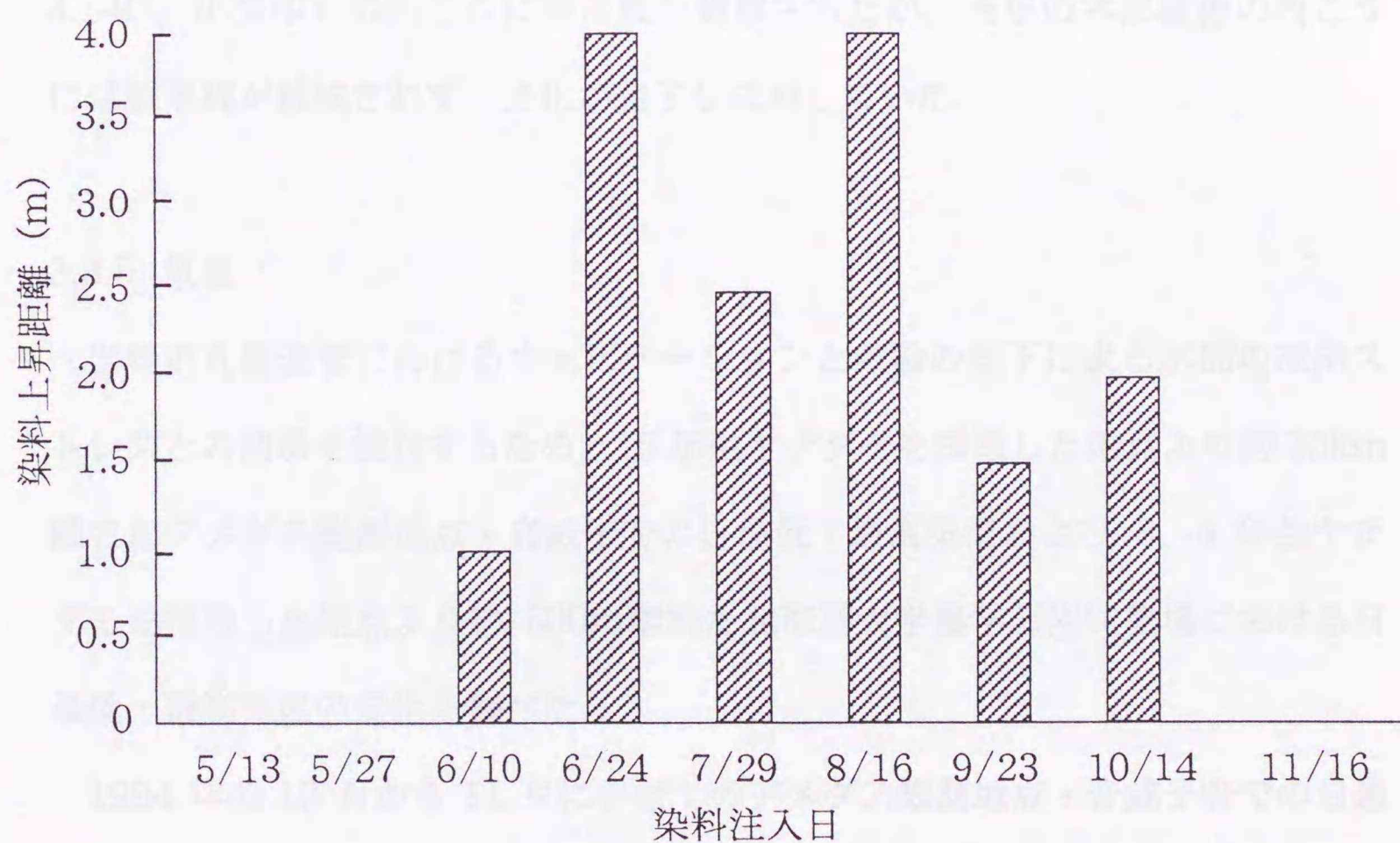


Fig. 3.13 ヤチダモの当年の孔圏道管の染色上限 (染料注入2時間後).

うに水もしくは原形質が観察された 8 月の試料の観察結果を示す。

当年の孔圏外部の形成層帯に近い部分では分化中の木部細胞の内こうに青く染色される原形質が見られた (Fig. 3.14A, 小矢印)。放射柔細胞の内こうにも原形質が見られた (Fig. 3.14A, 大矢印)。当年の孔圏外部のより孔圏部に近い部分では木部細胞の細胞壁が形成層帯に近い部分よりも厚くなっているのが見られた。この部位では木部細胞の内こうに原形質が観察された (Fig. 3.14B, 小矢印)。放射柔細胞の内こうにも原形質が見られた (Fig. 3.14B, 大矢印)。これに対して当年の孔圏部では、放射柔細胞 (Fig. 3.14C, 大矢印) と軸方向柔細胞 (Fig. 3.14C, 小矢印) の内こうに青く染色される原形質が見られたが、木部繊維の内こうには原形質がみられなかった。また、年輪境界付近においても、当年の軸方向柔細胞 (Fig. 3.14D, 大矢印) と前年のターミナル柔細胞 (Fig. 3.14D, 小矢印) の内こうに原形質が観察されたが、当年の木部繊維の内こうには原形質が観察されず、分化が完了し成熟していた。

3.3.5 気温

当年の孔圏道管におけるキャビテーションと気温の低下による木部の凍結ストレスとの関係を検討するため、15 年生ヤチダモを採取した地点より約 10km 離れたアメダス観測地点・音威子府の日最低・最高気温および 3, 4 年生ヤチダモを採取した地点より約 500m 離れた北海道大学農学部附属農場における日最低・最高気温の変化を調べた。

1994 年の 10 月から 11 月にかけてのアメダス観測地点・音威子府での日最高気温と日最低気温の変化を Fig. 3.15 に示す。この年の日最低気温が零度を最初に下回ったのは 10 月 18 日であった。日最高気温が零度を最初に下回ったのは 11 月 13 日であり、この日より日最高気温は 3 日間にわたって零度を下回

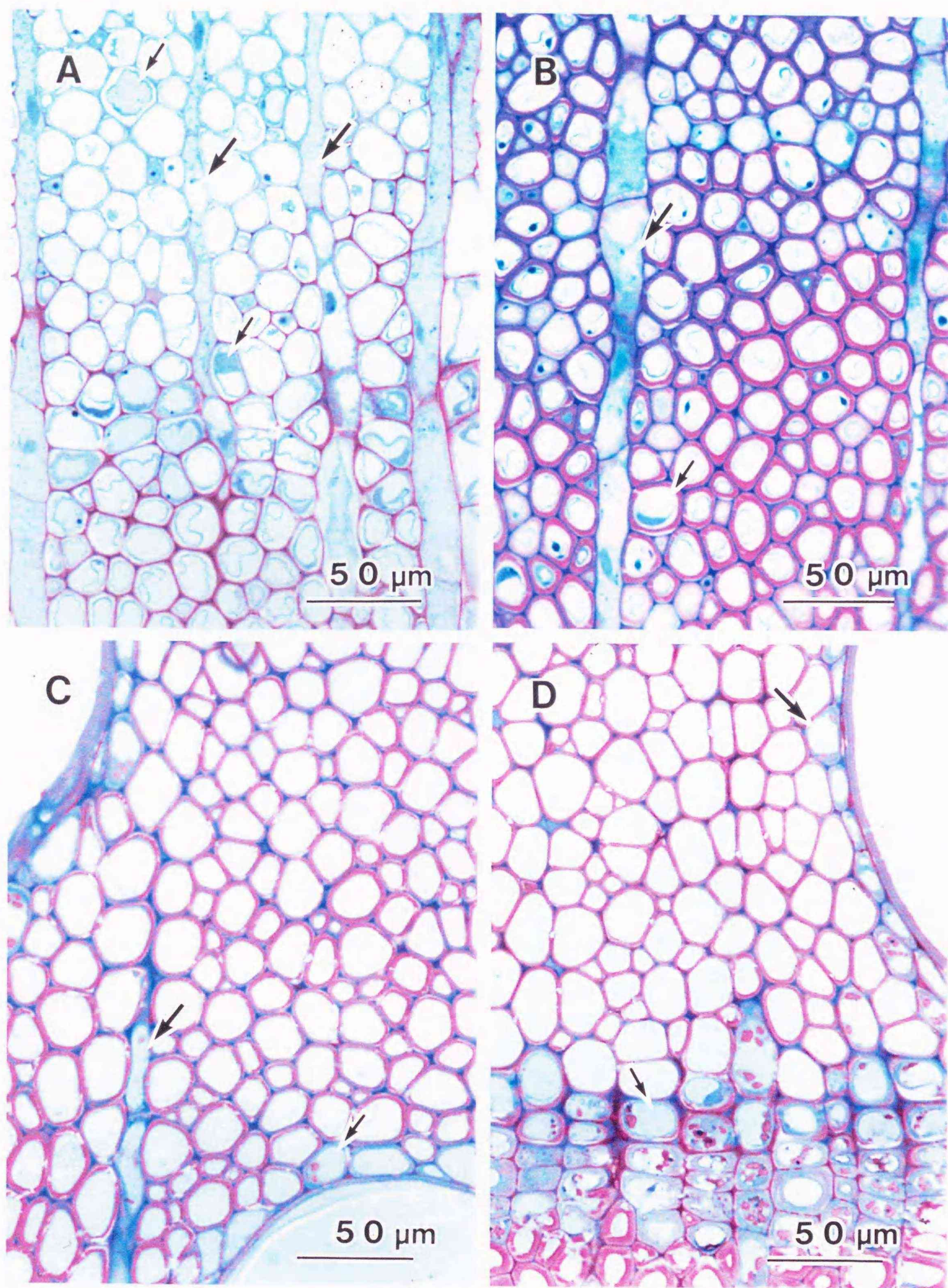


Fig. 3.14 15 年生ヤチダモの 8 月の光学顕微鏡写真. 木口面. メチレンブルー・アズール A-塩基性フクシンで染色. A, 孔圏外部. 小矢印は木部細胞, 大矢印は放射柔細胞を示す, B, 孔圏外部. 小矢印は木部細胞, 大矢印は放射柔細胞を示す. C, 孔圏部. 小矢印は軸方向柔細胞, 大矢印は放射柔細胞を示す. D, 年輪境界部. 小矢印はターミナル柔細胞, 大矢印は軸方向柔細胞を示す.

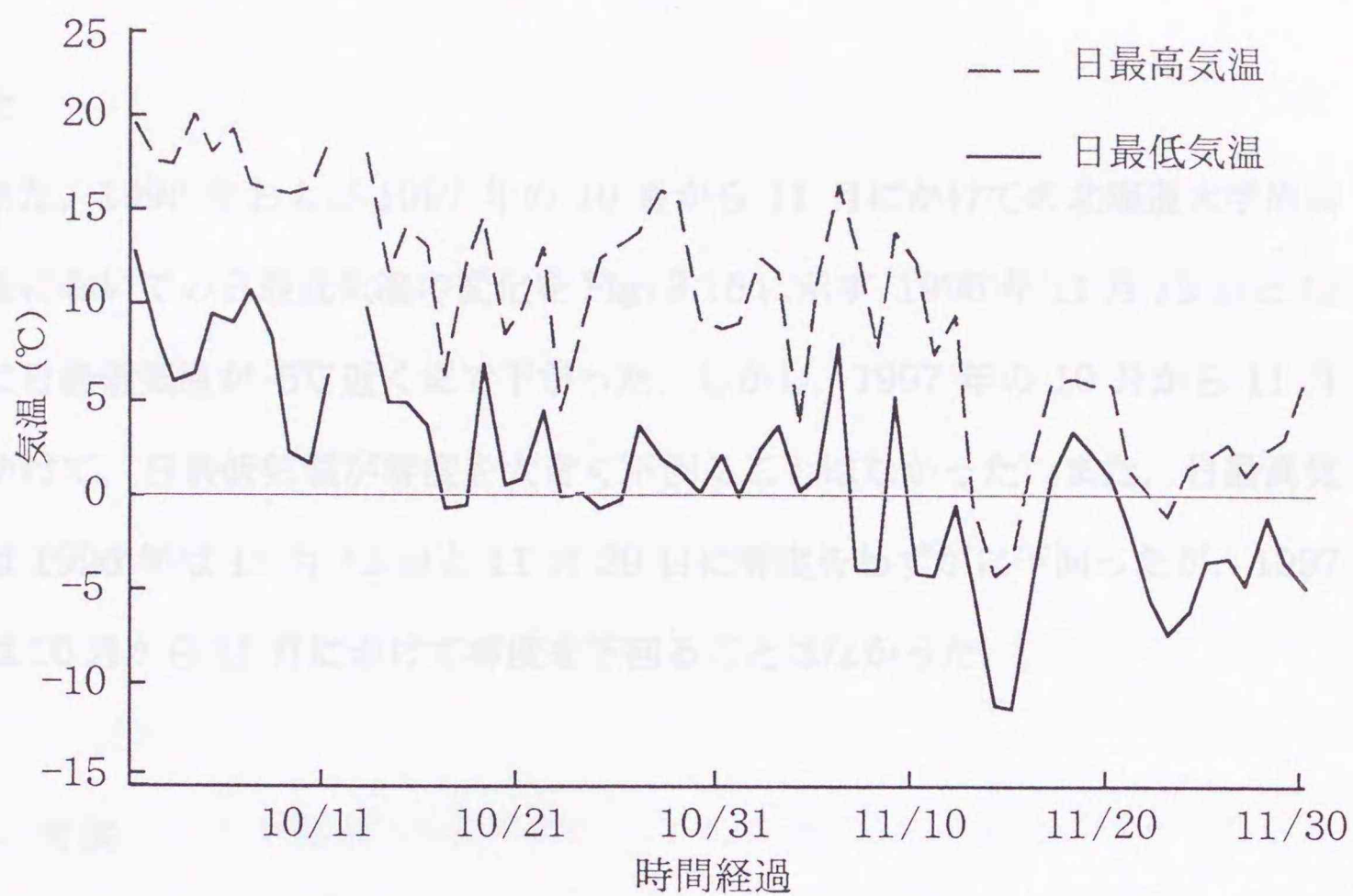


Fig. 3.15 1994年10月から11月にかけての音威子府における日最高気温と日最低気温の変化。
*10/12の測定データはない。

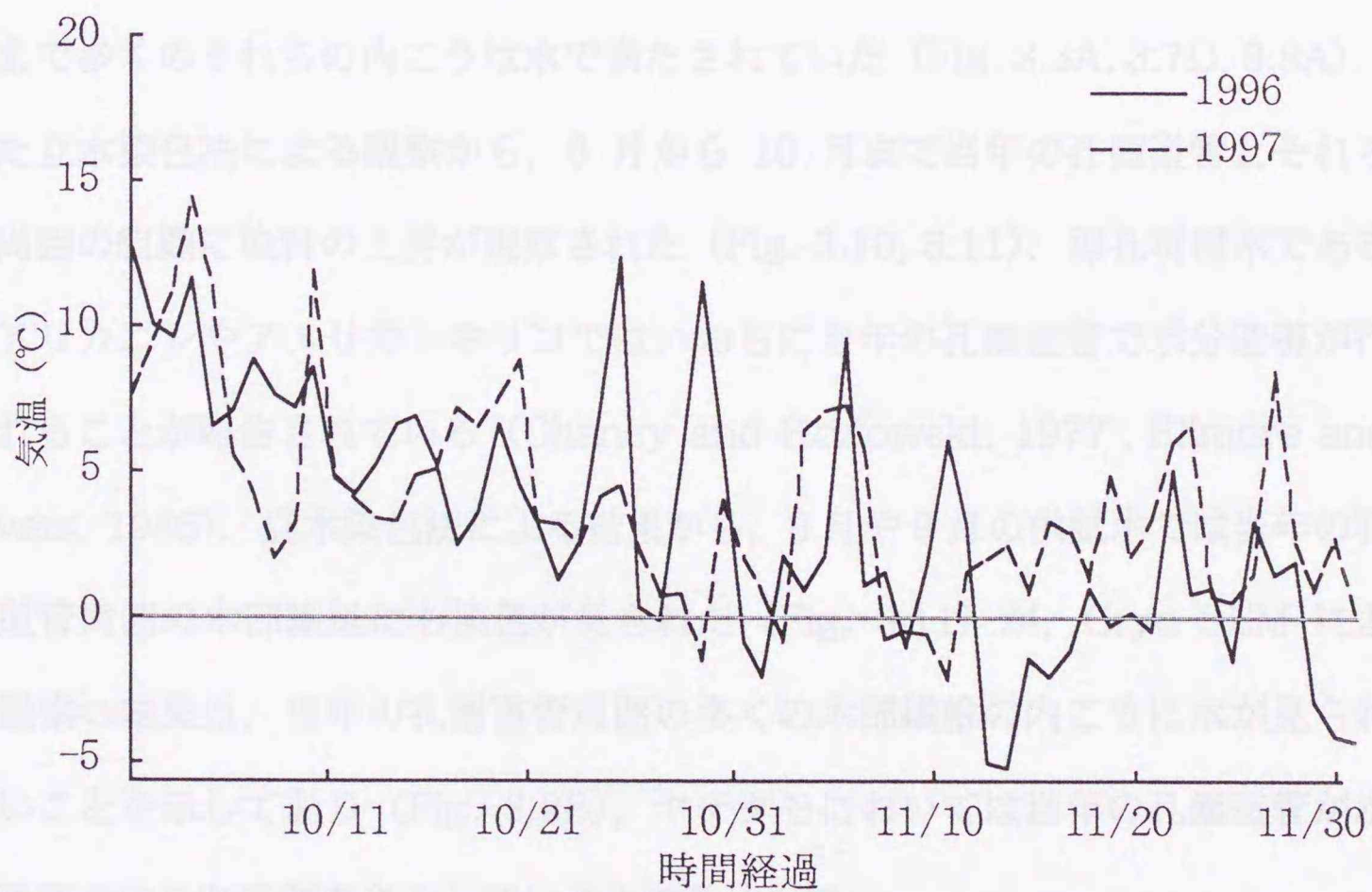


Fig. 3.16 1996年および1997年の10月から11月にかけての北海道大学農学部附属農場における日最低気温の変化。

った。

また、1996 年および 1997 年の 10 月から 11 月にかけての北海道大学附属農場においての日最低気温の変化を Fig. 3.16 に示す。1996 年 11 月 12 日と 13 日に日最低気温が -5°C 近くまで下がった。しかし、1997 年の 10 月から 11 月にかけて、日最低気温が零度を大きく下回ることにはなかった。また、日最高気温は 1996 年は 11 月 13 日と 11 月 29 日に零度をわずかに下回ったが、1997 年は 10 月から 11 月にかけて零度を下回ることにはなかった。

3.4 考察

Cryo-SEM による観察により、環孔材樹木であるヤチダモの当年および前年の木部における水分分布の季節変化を細胞単位で明らかにすることが出来た。15 年生と 3, 4 年生いずれの供試木においても当年の孔圏道管の形成完了後 10 月まで多くのそれらの内こうは水で満たされていた (Fig. 3.3A, 3.7D, 3.8A)。また立木染色法による観察から、6 月から 10 月まで当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織に染料の上昇が観察された (Fig. 3.10, 3.11)。環孔材樹木であるアメリカニレやアメリカトネリコでは、おもに当年の孔圏道管で水分通導が行われることが報告されている (Chaney and Kozlowski, 1977 ; Ellmore and Ewers, 1986)。立木染色法による結果から、8 月や 9 月の供試木では当年の孔圏道管周囲の木部繊維にも染色が見られた (Fig. 3.11) が、Cryo-SEM による観察の結果は、当年の孔圏道管周囲の多くの木部繊維の内こうに水が見られないことを示しており (Fig. 3.2B)、ヤチダモにおいては当年の孔圏道管が水分通導のおもな役割を果たしているとは結論される。

Cryo-SEM による観察の結果からすでに 5 月の時点で当年の孔圏道管の形成開始が観察され、当年の孔圏道管の内こうに水もしくは原形質が観察されたが

(Fig. 3.1), 立木染色法により, 当年の孔圏道管の内こうとそれらの周囲の組織に注入孔上 0.5m 以上まで染料の上昇が観察されたのは 6 月の試料からであった (Fig. 3.10). このことは 5 月中旬から下旬にかけては当年の孔圏道管はまだ完全に成熟しておらず, 5 月下旬から 6 月上旬までの間に当年の孔圏道管が成熟し, 水分通導を行うようになったことを意味する. なお, 5 月下旬には冬芽が開きかけており, この時点で蒸散がすでにおこなわれているとすると Cryo-SEM で道管の内こうに水が観察された前年の孔圏外道管 (Fig. 3.1A) がこの時期の水分通導に関与していると考えられる.

染料注入部よりも樹軸方向に高い部位で観察期間中に孔圏外道管とそれらの周囲の組織に染色が見られたのは, 立木染色を 2 時間行った 8 月の供試木の注入孔上 0.5m の部位だけであったのに対して, 同一供試木の当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織には注入孔上 4.0m の部位まで染料の上昇が観察された. 当年の孔圏道管が成熟し, 水分通導を行っている時期では, 孔圏外道管は水分通導に補助的な役割を果たしているだけであると考えられる.

立木染色法で染色が観察された木部の領域は染料注入孔からの樹軸方向の距離が増加するにつれて接線方向に広がる傾向が認められた (Fig. 3.11E). ヤチダモと同じトネリコ属のヨーロッパヤチダモの道管は接線方向や放射方向に蛇行しながら走行して 3 次元ネットワークを形成し, これらの道管には相互に接触している側壁があると報告されている (Burggraaf, 1972). ヤチダモにおいても染料注入孔より道管に吸い上げられた染料が相互に接触しているそれらの側壁の道管相互壁孔対を経由して隣接する道管に移動し, 道管の 3 次元ネットワークにより接線方向に広がったことが考えられる.

当年の木部では, その形成の開始からほぼ終了する 9 月まで, 内こうが水もしくは原形質で満たされている木部繊維が Cryo-SEM による観察で認められ

た。6月の時点ではほとんどすべての当年の木部繊維の内こうが水もしくは原形質で満たされていた (Fig. 3.1D) が、季節の推移とともに、内こうに水もしくは原形質が認められない木部繊維が年輪のイニシャル部付近から観察されるようになり、9月の時点では年輪のターミナル部付近の木部繊維の内こうに水もしくは原形質が観察されるだけとなった (Fig. 3.2C, D)。7月の当年の孔圏部を Cryo-SEM により観察したところ、木部繊維の内こうの水分の観察面は道管の内こうの水の観察面と異なって見えるものもあり (Fig. 3.2A)、木部繊維の内こうの水分が原形質である可能性が考えられた。当年の木部繊維の内こうの水分が原形質であるかどうかを検討するため、8月の試料を用いてメチレンブルー・アズール A および塩基性フクシンの二重染色法 (Humphrey and Pittman, 1974 ; Schneider, 1981) により当年木部の細胞内こうの原形質の存否を調べたところ、孔圏外部の多くの木部細胞内こうに原形質が観察されたのに対して孔圏部の木部繊維の内こうはメチレンブルー・アズール A および塩基性フクシンにより染色されなかった (Fig. 3.14)。この観察結果と Cryo-SEM による観察結果から、当年の木部繊維の内こうから水分が季節の推移とともに消失していく現象は、木部繊維が成熟して、原形質を失っていく過程であることが明らかになった。

成長期間中は内こうに水を保持していた当年の孔圏道管に、中川地方演習林の15年生のヤチダモにおいては10月から11月の期間に、札幌実験苗畑の3、4年生のヤチダモにおいては1996年は11月中旬から12月中旬にかけて、1997年は11月上旬から下旬にかけてキャビテーションが起きた (Fig. 3.3, 3.4, 3.8, 3.9)。キャビテーションが起きるおもな原因としては、過度の水ストレスと木部の凍結が考えられているが、本章で観察された当年の孔圏道管におけるキャビテーションは供試木が落葉している時期に起きており、蒸散により強い水ス

トレスが孔圏道管に加えられたとは考えにくい。したがって、木部の凍結により当年の孔圏道管にキャビテーションが引き起こされたのではないかと推定した。キャビテーションが発生したと思われる時期の気温の変化を15年生と3, 4年生の供試木でそれぞれ調べたところ (Fig. 3.15, 3.16), 中川地方演習林の15年生のヤチダモの場合、当年の孔圏道管にキャビテーションが起きた期間中に日最高気温が氷点下の日 (真冬日) が3日間連続していたことが確認された。この真冬日の連続により木部が凍結することは十分に考えられる。これまでに冬期間の気温が氷点下を記録する地域に生育する環孔材樹木の木部では秋期から冬期にかけての気温が最初に零度を下回った後に透水度が著しく低下することが報告されている (Cochard and Tyree, 1990 ; Cochard et al., 1992 ; Sperry and Sullivan, 1992 ; Sperry et al., 1994 ; Hacke and Sauter, 1996a)。ヤチダモの当年の孔圏道管においても木部の凍結によりキャビテーションが起きたと考える。

しかし、札幌実験苗畑に生育する3, 4年生のヤチダモの場合、1996年11月中旬以前に日最低気温が零度を下回る日があることが確認されたにもかかわらず、11月中旬の試料の当年の孔圏道管にキャビテーションは観察されなかった。これに対して1997年には、10月から11月にかけて日最低気温が零度を大きく下回ることがなかったにもかかわらず、11月下旬の試料の当年の孔圏道管にキャビテーションが観察された。1996年の観察において11月中にキャビテーションが観察されなかった原因としては、供試木の木部が凍結に至るまでの十分な気温低下が供試木周辺では起こらなかったためとも考えられる。しかし1997年の観察においては、日最低気温が零度を大きく下回った日なかったにもかかわらず、当年の孔圏道管にキャビテーションが起きている。この原因としては気温の観測地と供試木の植栽地が直線距離にして約500m離れてい

たために、観測気温が供試木の周囲の気温の変動と対応しない可能性も考えられる。

このように本章で述べたヤチダモにおける 10 月から 12 月にかけての当年の孔圏道管におけるキャビテーションが木部の凍結によるとは断定できなかった。凍結により当年の孔圏道管にキャビテーションが起きるかどうかを確認するためには、温度条件を人工的に調節して木部を確実に凍結させて当年の孔圏部における水分の挙動を観察する必要がある。

また、15 年生のヤチダモの当年の孔圏道管の内こうから水が消失していた時期に、孔圏道管周囲の木部繊維の内こうが水で満たされていた (Fig. 3.4) が、3, 4 年生のヤチダモを用いた実験からは、孔圏道管の内こうから水が消失していた時期に、孔圏部の一部の木部繊維の内こうに水が見られるものの、多くの木部繊維の内こうには水が認められなかった (Fig. 3.8, 3.9)。15 年生のヤチダモではキャビテーションが起きたときに孔圏道管の内こうの水がそれらの周囲の木部繊維の内こうに移動したとも考えられるが、3, 4 年生のヤチダモの孔圏道管の内こうの水がどこに移動したのかについては明らかにすることができなかった。木部の凍結とキャビテーションの関係については第 5 章でさらに検討を行う。

本章では環孔材樹木であるヤチダモの木部水分分布の季節変化を Cryo-SEM を用いて検討した。さらに、立木染色法を併用することにより水分通導を行っている通水系の特定を試みた。Cryo-SEM では成長期間中、当年の多くの孔圏道管の内こうが水で満たされていることが明らかになった。また、立木染色法からは成長期間中、染料注入部より上部の当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織が染色されているのが観察された。以上のことから、当年の孔圏道管が水分

通導のおもな役割を果たしている」と結論される。これに対して、孔圏外道管では前年の木部でもそれらの内こうに水を保持しており、水分通導の補助的な役割を果たしていることが考えられた。また、Cryo-SEM 法と光学顕微鏡法による観察から当年の木部繊維の内こうの原形質が成長期間中年輪のイニシャル部から外方へ次第に消失していくことを明らかにした。Cryo-SEM 観察により当年の孔圏道管の内こうの水が秋期から冬期にかけての一時期にほとんどなくなることが確認された。この現象が見られた前後での気温変化との対応から 15 年生のヤチダモでは木部の凍結によりキャビテーションが起きたと考察したが、3, 4 年生のヤチダモでの同様の現象の原因は明らかにできなかった。

第4章 シラカンバとオノエヤナギの木部水分分布の季節変化と水分通導

4.1 はじめに

環孔材樹木の木部における水分通導が、当年の孔圏道管でおもに行われることはこれまでも報告されている (Chaney and Kozlowski, 1977 ; Ellmore and Ewers, 1986). しかしながら、孔圏道管は翌年の春までに水分通導機能障害を起こし、それ以降その機能障害から回復しないと考えられている (Zimmermann, 1983). 本論文の第3章においても、環孔材樹木であるヤチダモではおもに当年の孔圏道管が水分通導を行うが、秋期から冬期にかけての一時期に当年の孔圏道管にキャビテーションが起き、翌年の成長期になっても前年の孔圏道管が再び水で満たされることがないことを明らかにした。これに対して、散孔材樹木では水分通導は辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲の道管で行われることが報告されている (Greenidge, 1957b ; Kozlowski and Winget, 1963). このことは散孔材樹木の道管が、環孔材樹木の孔圏道管と異なり、数年以上にわたり水分通導機能を保持していることを意味する。

樹木の木部における水分通導の季節変化を示す指標としては、これまでおもに透水性 (Tyree and Dixon, 1986 ; Sperry et al., 1988b) が用いられている。気温が冬期間に氷点下を記録する地域に生育する散孔材樹木においては、透水性が冬期間に他の季節よりも低下することが報告されている (Sperry and Sullivan, 1992 ; Sperry et al., 1988c ; Sperry, 1993 ; Sperry et al., 1994 ; Magnani and Borghetti, 1995). このことは、これらの散孔材樹木において冬期間に水分通導機能障害が起きていることを示唆している。

カバノキ属やカエデ属の樹種では開葉前の時期に木部の透水性が上昇することが報告されている (Sperry et al., 1988c ; Sperry, 1993 ; Hacke and Sauter,

1996a). これまで木部の正圧はおもに木部にせん孔してそのせん孔部の圧力をマノメーターで測定することにより求められているが、カバノキ属やカエデ属の樹木でこの手法により開葉前の春期に正圧が測定されることが報告されており (Merwin and Lyon, 1909 ; Kramer and Kozlowski, 1960 ; Sperry, 1993 ; Sperry et al., 1994 ; Hacke and Sauter, 1996a), この正圧により通水系は水で再び満たされることがあると考えられている (Hacke and Sauter, 1996a). 冬期間に散孔材樹木の通水系に水分通導機能障害が起きた場合、翌年の春期に通水系が水分通導機能を回復するのには木部で測定される正圧が関与している可能性がある.

しかしながら、木部の正圧がマノメーターでは測定されない針葉樹においても透水度が秋期と比較して冬期に一旦低下した後、春期に再び増加することが報告されており (Sperry, 1993 ; Sperry et al., 1994), 冬期から春期にかけての水分通導機能の回復がすべての樹種において木部の正圧で行われるとは考えられていない.

このように透水度を定期的に測定した研究から、散孔材樹木においても冬期間に水分通導機能障害を起こすことは示唆されているものの、散孔材樹木において秋期から冬期にかけて水分通導機能障害が起こる過程と春期に水分通導機能の障害から回復する過程での木部の水分分布、とくに道管内この水の量や存在領域の変化については明らかになっていない.

そこで本章では散孔材樹木のシラカンバとオノエヤナギの枝を Cryo-SEM により定期的に観察し、木部水分分布の季節変化を検討した. カバノキ科 (Betulaceae) ではカバノキ属のほかにハンノキ属 (*Alnus*) の樹木においても開葉前の木部に正圧が測定されることがこれまでも報告されている (Sperry et al., 1994). これに対して、ヤナギ科 (Salicaceae) のヤマナラシ

属 (*Populus*) の樹木では木部の正圧がマンノメーターによる測定では記録されなかったことが報告されている (Sperry et al., 1994). また, シラカンバでは開葉前の時期に樹幹からの溢泌現象が報告されている (寺沢, 1996) が, オノエヤナギでは報告例がない. このように開葉前の木部の圧力が大きく異なると考えられる両樹種を用いて水分通導の季節変化を検討した. また, 散孔材樹木における水分通導機能の障害が, 第 3 章で述べたような環孔材樹木であるヤチダモの孔圈道管に起きるような一時期のキャビテーションに起因するのかどうかを検討した. 散孔材樹木では辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲の道管が水分通導に関わっていると考えられるため, シラカンバの樹幹についても木部水分分布を Cryo-SEM を用いて観察し, 加えて木部における水分通導の経路を特定するため, 成長期間中のシラカンバに立木染色を行い観察した.

4.2 実験方法

4.2.1 供試木

北海道大学構内に生育するシラカンバ (樹高約 8m, 胸高直径 15cm) とオノエヤナギ (樹高約 15m, 胸高直径約 40cm) および北海道美深町の民有林に生育するシラカンバ (樹高 5~8m, 胸高直径 5~10cm, 樹齢 10~16 年) を供試木として使用した.

4.2.2 Cryo-SEM 法の試料採取と観察試料の作製

試料の採取および作製は第 2 章の 2.2.2 に準じた.

北海道大学構内に生育するそれぞれ 2 本のシラカンバとオノエヤナギの枝より, 3 ないし 4 年輪を形成している枝の節間から, Cryo-SEM 用の試料を採取した. 1996 年の 3 月, 4 月, 8 月と 1996 年の 11 月から 1997 年の 4 月まで 1

ヶ月ごとに試料の採取を行った。

また、1997 年の 3 月、4 月、8 月に北海道美深町の民有林に生育するシラカンバよりそれぞれ 2 本ずつ樹幹の胸高部から試料を採取し Cryo-SEM 観察に用いた。

シラカンバおよびオノエヤナギの枝における、空隙が存在した道管の割合の季節変化を定量化するため、樹皮側から数えて 1, 2 年輪目から 1 年輪を選択し、110 倍以上に拡大された木口面の SEM 写真を用いて各時期につき 100 個以上の道管（内こうの接線径が $20\mu\text{m}$ 以上のもの）を写真上で観察し、内こうが水で満たされている道管要素と接線径が $20\mu\text{m}$ 以上の空隙が存在する道管要素をそれぞれ数え、空隙を含んだ道管の割合を決定した。

4.2.3 立木染色法による染料注入と試料採取

北海道美深町の民有林に生育するシラカンバの樹幹に 1997 年 8 月に立木染色を行った。電動式ドリルを用いて樹皮から髓まで直径 8mm の注入孔を開け、0.1%サフラニン水溶液を吸引させた。試料の採取および作製は第 2 章の 2.2.3 に準じた。1 時間の染料注入を 2 本の供試木に行い、染色部位を含む樹幹を採取した。

4.2.4 気温および地温のデータ

シラカンバおよびオノエヤナギの枝を採取した地点より約 1km 離れた北海道大学農学部附属農場で常時観測している日最低気温、日最高気温、地温（地下 10cm）の記録を利用した（北海道大学農学部, 1996, 1997）。

4.3 結果

4.3.1 シラカンバとオノエヤナギの枝の木部水分分布の季節変化

シラカンバおよびオノエヤナギの枝の木部水分分布の季節変化を Cryo-SEM 法により観察した。1 月から 4 月にかけては前年と前々年の木部の水分分布の季節変化の結果を、8 月から 12 月にかけては当年および前年の木部の水分分布の季節変化の結果を以下に記す。

3 月には、開葉はまだ起きておらず、シラカンバ、オノエヤナギともに当年の木部の形成もまだ始まっていなかった。前年と前々年の木部水分分布の違いは観察されなかった。シラカンバの木部では、内こうに水が見られない道管と (Fig. 4.1A, 小矢印)、内こうが水で満たされている道管が存在した (Fig. 4.1A, 大矢印)。多くの木部繊維の内こうには水が見られなかった。Fig. 4.1B は前々年の木部の木口面である。内こうに水が存在しない道管と内こうが水で満たされている道管が観察される。内こうに水が存在しない道管には階段せん孔板 (矢印) が見られるものもある。板目面の観察からは、内こうに水が存在していない道管や (Fig. 4.1C)、内こうの一部を塞ぐように水が存在している道管が観察された (Fig. 4.1D, アステリスク)。また、内こうに水が見られる木部繊維もあった (Fig. 4.1C, 矢印)。オノエヤナギにおいても同様に、内こうに水が見られない道管と内こうが水で満たされている道管が観察されたが、年輪のターミナル部付近の多くの小道管の内こうが水で満たされていた (Fig. 4.2A, 矢印)。また、多くの木部繊維の内こうには水が認められなかった (Fig. 4.2B)。柾目面の観察からは、内こうの一部を塞ぐように水が存在している道管や (Fig. 4.2C, アステリスク)、内こうの一部に水が存在している道管がみられた (Fig. 4.2D, アステリスク)。内こうに空隙が存在した道管の割合は前年および前々年の木部においてシラカンバで約 80%, オノエヤナギで約 70% であった (Fig. 4.3)。

4 月になっても開葉はまだ起きていなかった。オノエヤナギの形成層活動は

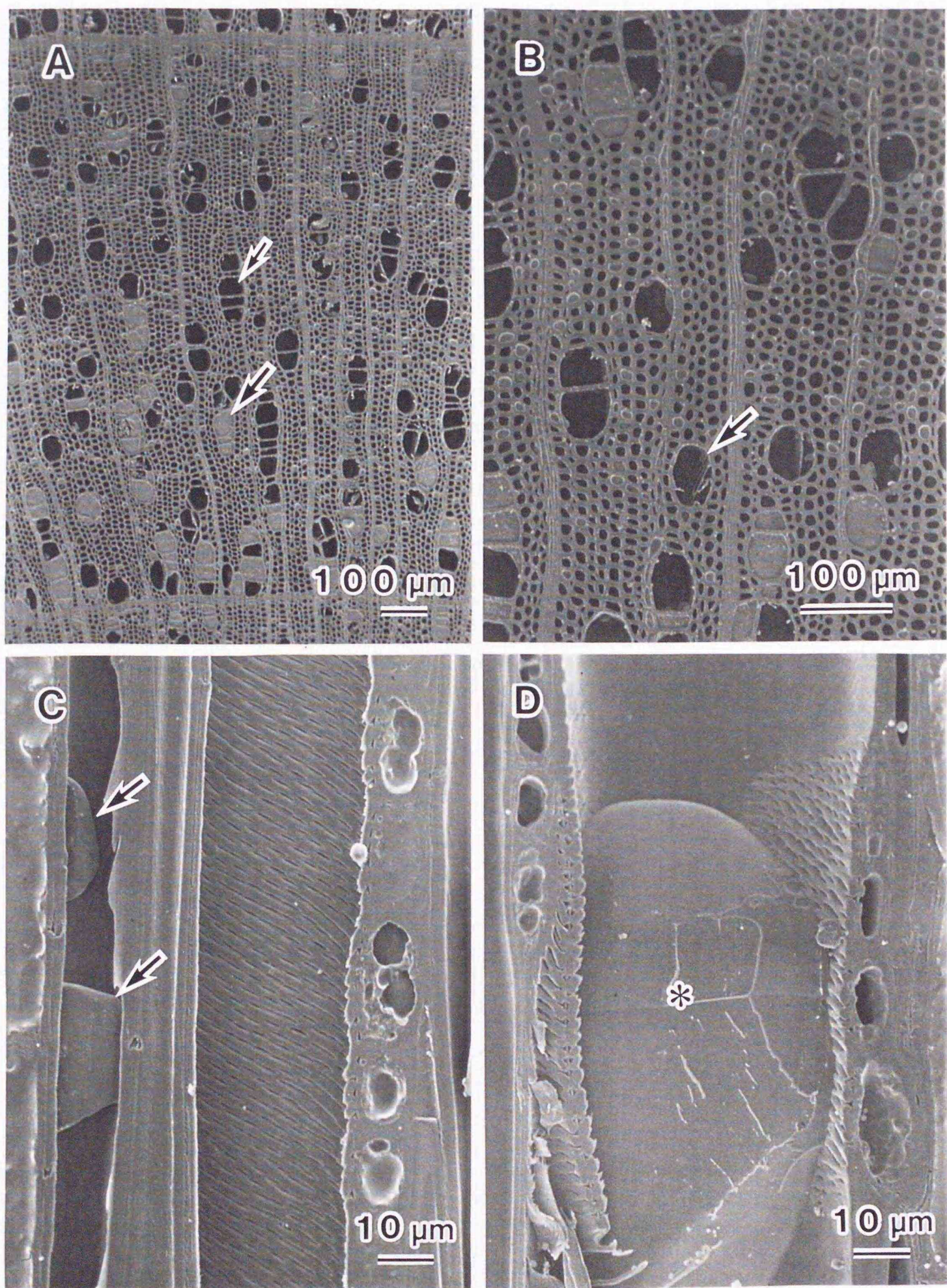


Fig. 4.1 シラカンバの枝の 3 月の Cryo-SEM 写真. A, 前々年の木部の木口面. 小矢印は水が見られない道管, 大矢印は水で満たされている道管を示す. B, A の一部の拡大. 矢印は階段せん孔板を示す. C, 前々年の木部の板目面. 矢印は木部繊維内この水を示す. D, 前々年の木部の板目面. アステリスクは道管内この水を示す.

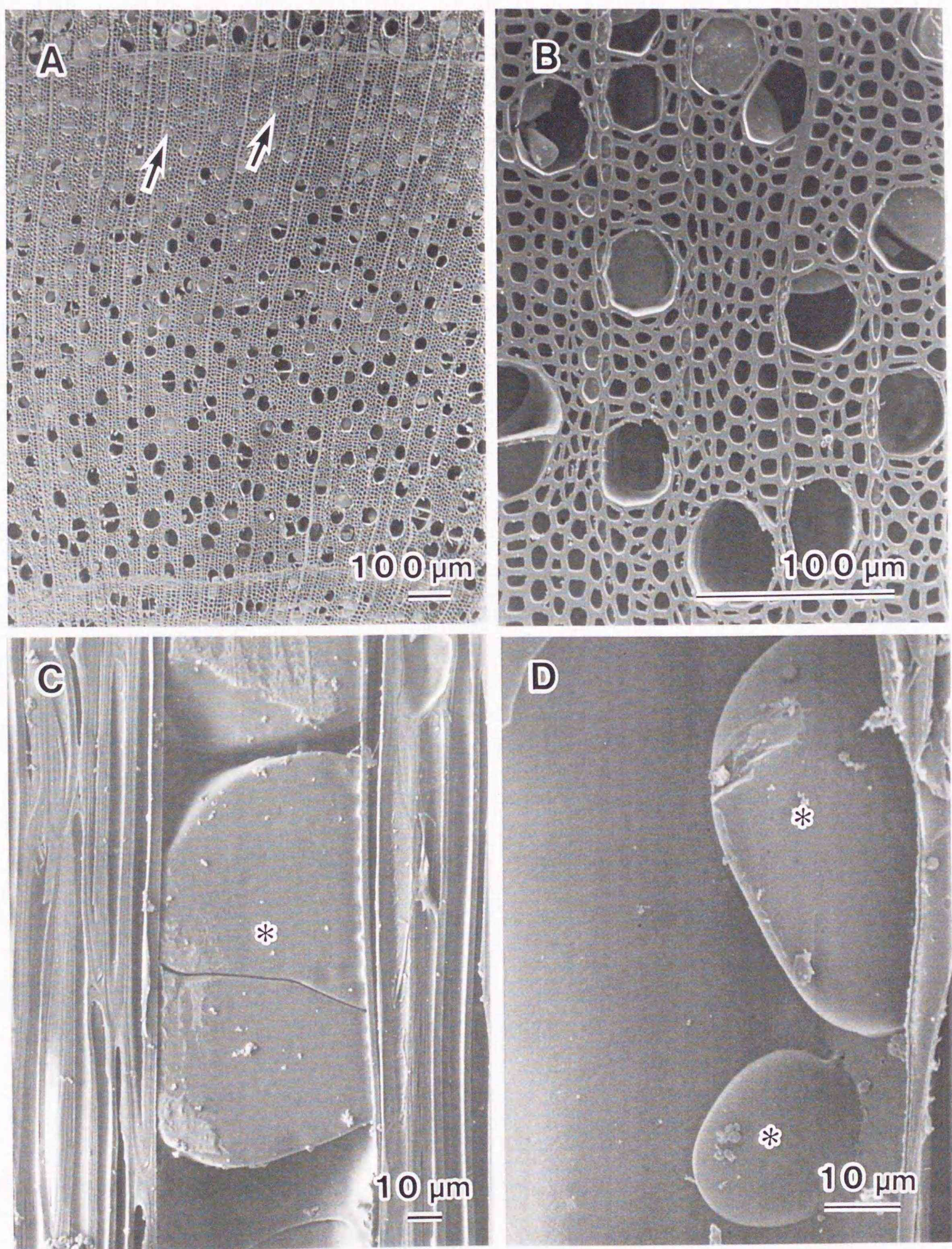


Fig. 4.2 オノエヤナギの枝の3月のCryo-SEM写真. A, 前々年の木部の木口面. 矢印は水で満たされている道管を示す. B, Aの一部の拡大. C, 前々年の木部の柢目面. アステリスクは道管内この水を示す. D, 前々年の木部の柢目面. アステリスクは道管内この水を示す.

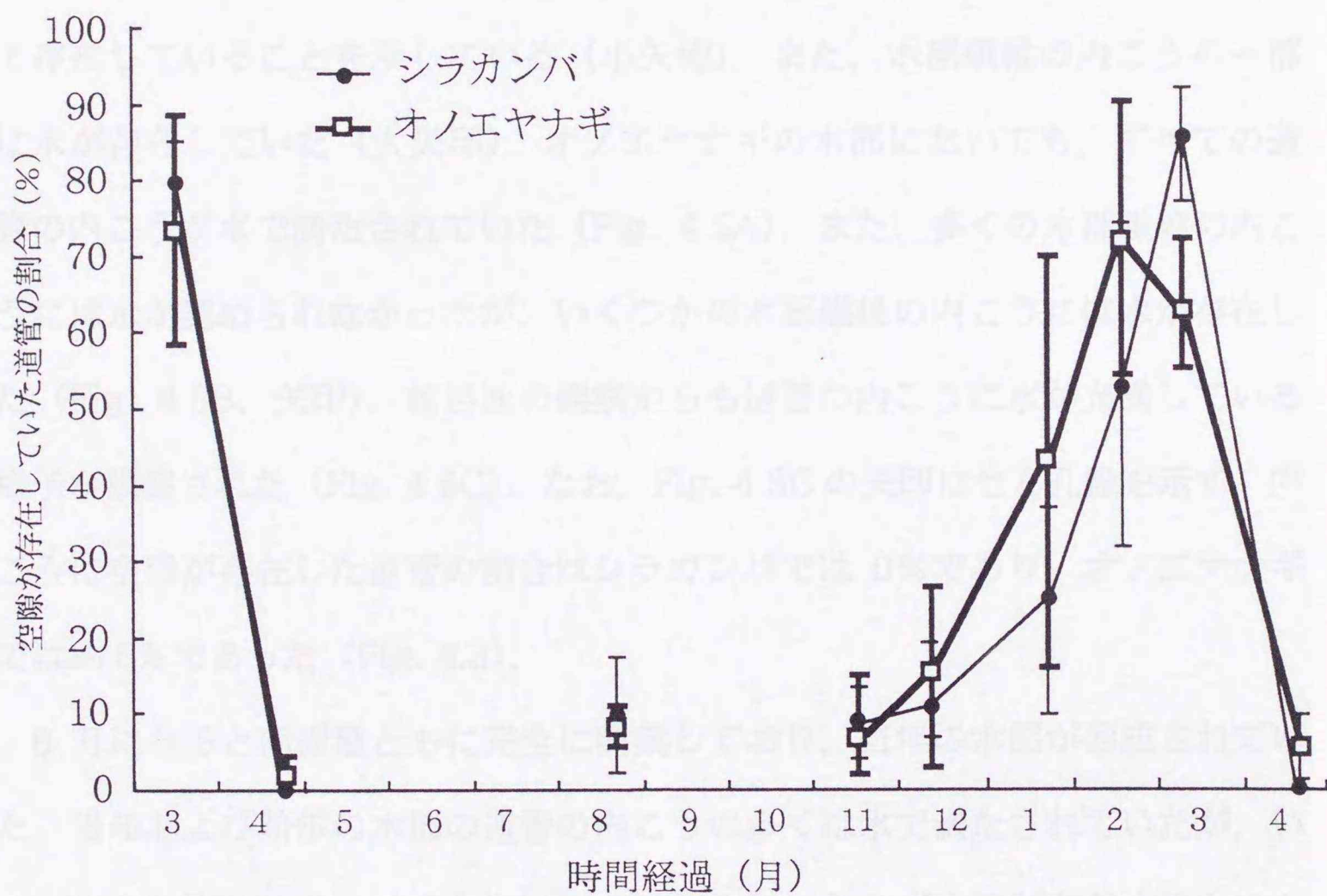


Fig. 4.3 シラカンバとオノエヤナギの枝における空隙が存在していた道管の割合の変化.

始まっていたが、シラカンバではまだ始まっていなかった。シラカンバの木部ではすべての道管の内こうが水で満たされていた (Fig. 4.4A)。また、多くの木部繊維の内こうには水が見られなかったが、いくつかの木部繊維の内こうには水が存在した (Fig. 4.4B, 矢印)。柾目面の観察からも、道管の内こうが水で満たされている様子が観察された (Fig. 4.4C)。Fig. 4.4C では、道管の階段せん孔板のバーの一部がみられ、上下に接している道管要素間でも水が連続して存在していることを示している (小矢印)。また、木部繊維の内こうの一部に水が存在していた (大矢印)。オノエヤナギの木部においても、すべての道管の内こうが水で満たされていた (Fig. 4.5A)。また、多くの木部繊維の内こうには水が認められなかったが、いくつかの木部繊維の内こうには水が存在した (Fig. 4.5B, 矢印)。柾目面の観察からも道管の内こうに水が充満している様子が観察された (Fig. 4.5C)。なお、Fig. 4.5C の矢印はせん孔縁を示す。内こうに空隙が存在した道管の割合はシラカンバでは 0% であり、オノエヤナギでは約 5% であった (Fig. 4.3)。

8 月になると両樹種ともに完全に開葉しており、当年の木部が形成されていた。当年および前年の木部の道管の内こうの多くは水で満たされていたが、いくつかの道管の内こうは完全には水で満たされておらず空隙が存在するものもあった。シラカンバの当年木部では、多くの木部繊維の内こうには水が認められなかったが (Fig. 4.6A)、ターミナル部付近の木部繊維の内こうには水もしくは原形質が観察された (Fig. 4.6B, 矢印)。オノエヤナギの当年木部では大部分の木部繊維の内こうには水もしくは原形質が観察された (Fig. 4.6C)。しかし年輪境界付近の木部繊維の多くには内こうに水が認められなかった (Fig. 4.6D, 矢印)。内こうに空隙が存在した道管の割合は当年および前年の木部において両樹種共に約 10% であった (Fig. 4.3)。

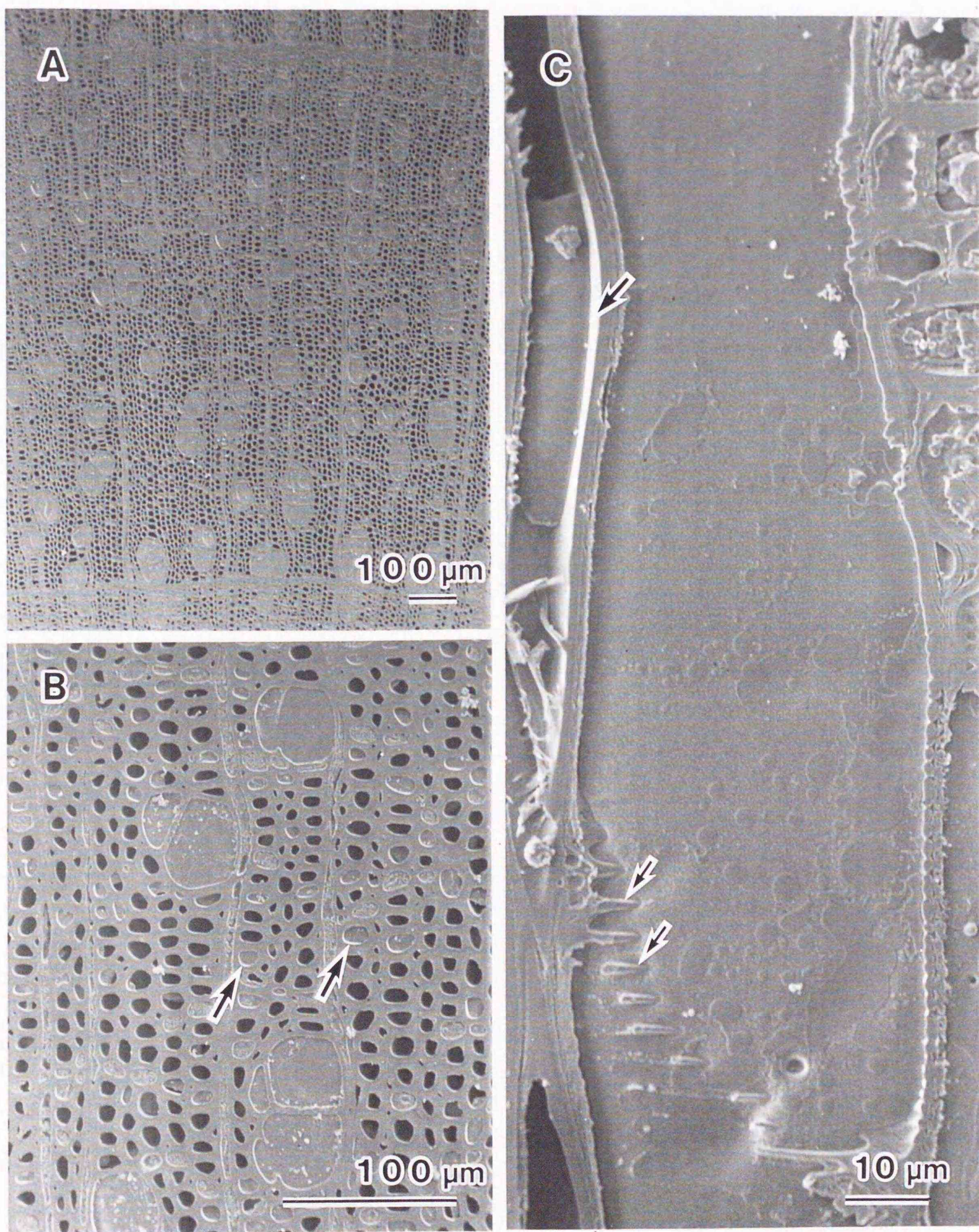


Fig. 4.4 シラカンバの枝の 4 月の Cryo-SEM 写真. A, 前々年の木部の木口面. B, 前々年の木部の木口面. 矢印は水で満たされている木部繊維を示す. C, 前年の木部の柾目面. 大矢印は木部繊維内この水, 小矢印は階段せん孔板のバーの一部を示す.

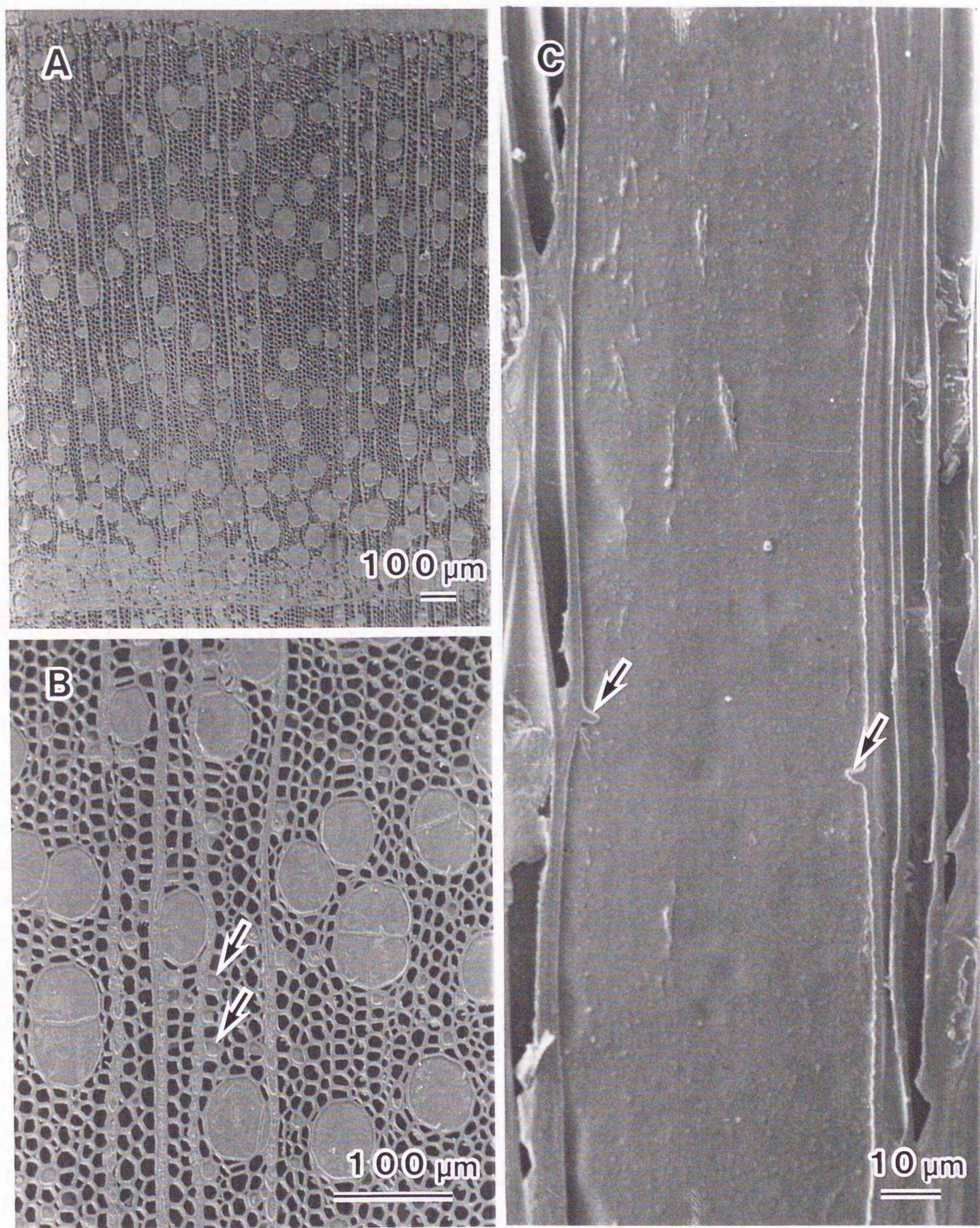


Fig. 4.5 オノエヤナギの枝の 4 月の Cryo-SEM 写真. A, 前年の木部の木口面. B, A の一部の拡大. 矢印は水で満たされている木部繊維を示す. C, 前年の木部の柁目面. 矢印はせん孔縁を示す.

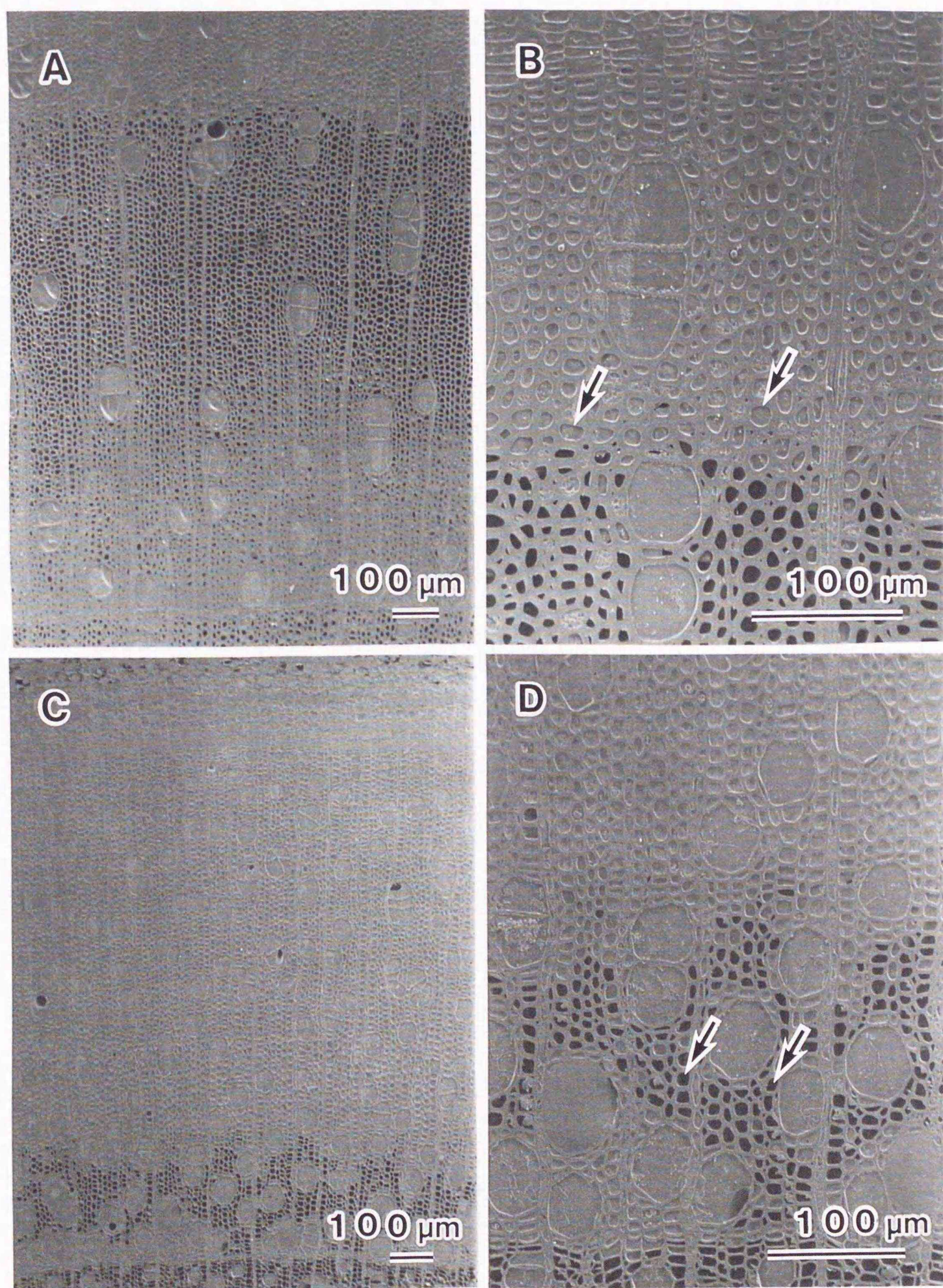


Fig. 4.6 シラカンバおよびオノエヤナギの枝の 8 月の Cryo-SEM 写真.
木口面. A, シラカンバの当年の木部. B, シラカンバの当年の
ターミナル部. 矢印は水もしくは原形質で満たされている木部
繊維を示す. C, オノエヤナギの当年の木部. D, オノエヤナギ
の当年のイニシャル部. 矢印は水が見られない木部繊維を示す.

11 月から 2 月にかけて両樹種は落葉していた。内こうに空隙が存在した道管の割合は、時間の経過とともに両樹種共に増加した (Fig. 4.3)。しかしながら両樹種においても、また各採取時期においても内こうに空隙が認められた道管に存在している水の量はさまざまであった。

11 月において、シラカンバの木部では大部分の道管の内こうが水で満たされているのに対して、当年の木部も含めて多くの木部繊維の内こうには水が認められなかった (Fig. 4.7A)。同様にオノエヤナギの木部でもほとんど大部分の道管の内こうが水で満たされているのに対して、当年の木部も含めた多くの木部繊維の内こうに水が認められなかった (Fig. 4.7B)。

12 月の時点でもシラカンバの木部では大部分の道管の内こうが水で満たされていたが、内こうに水が認められない道管も存在した (Fig. 4.7C, 矢印)。多くの木部繊維の内こうには水が認められなかった。オノエヤナギの木部でも多くの道管の内こうが水で満たされていたが、内こうに水が認められない道管も観察された (Fig. 4.7D, 矢印)。多くの木部繊維の内こうには水が認められなかった (Fig. 4.7D)。

1 月になると内こうに空隙が存在した道管の割合は増加した (Fig. 4.3)。シラカンバの木部では、内こうが水で満たされている道管と内こうに水が認められない道管が存在し、内こうが水で満たされている木部繊維と内こうに水が認められない木部繊維もそれぞれあった (Fig. 4.8A)。オノエヤナギの木部でも、内こうに水が認められない道管と内こうが水で満たされている道管があった (Fig. 4.8B)。年輪ターミナル部の小道管の内こうは水で満たされていた (Fig. 4.8B, 矢印)。多くの木部繊維の内こうには水が見られなかった。

2 月になると、内こうに空隙が存在した道管の割合は両樹種においてさらに増加した (Fig. 4.3)。シラカンバの木部では、1 月と同様に内こうが水で満た

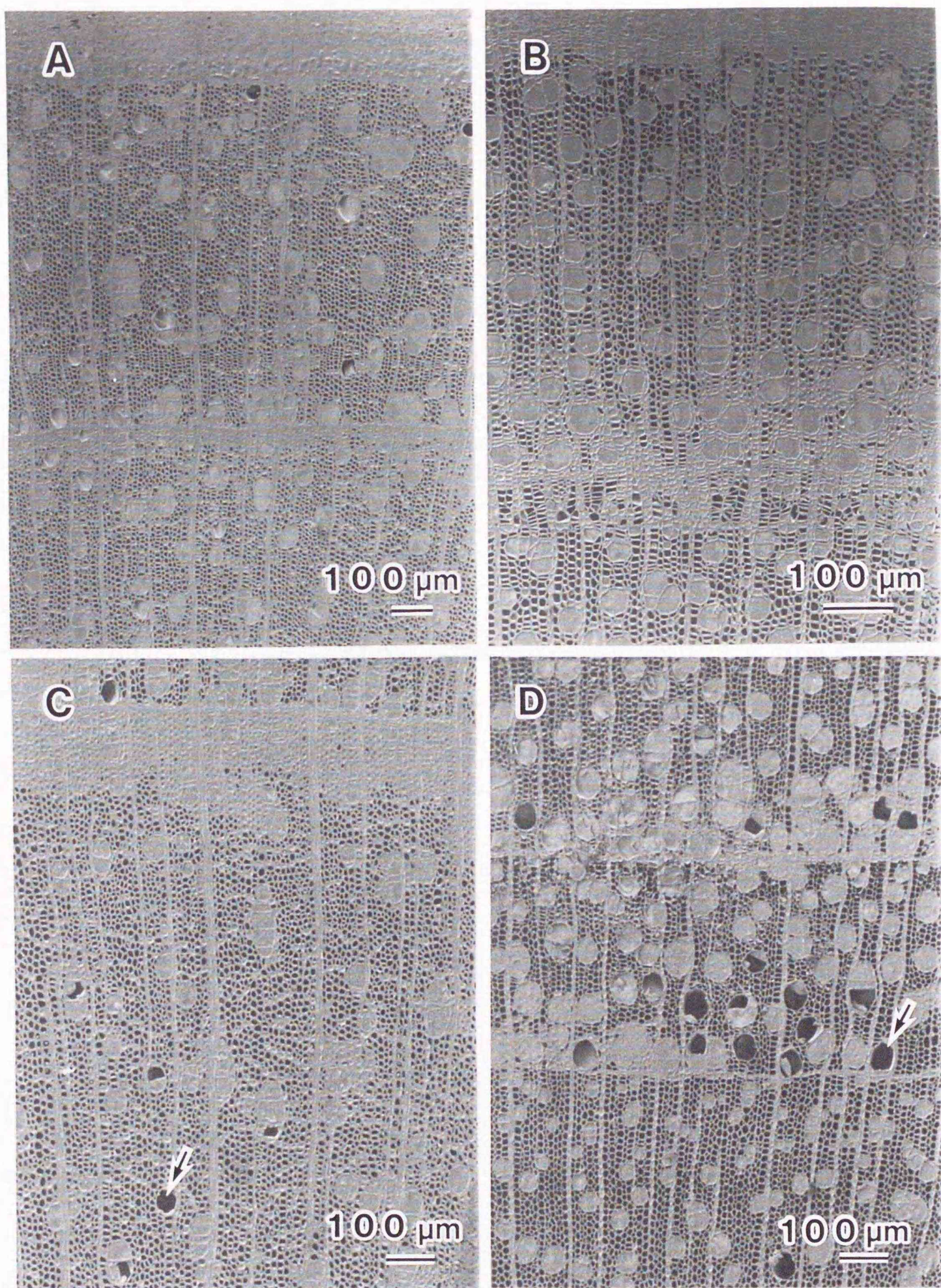


Fig. 4.7 シラカンバおよびオノエヤナギの枝の 11 月と 12 月の Cryo-SEM 写真. 木口面. A, シラカンバの 11 月の当年木部. B, オノエヤナギの 11 月の当年木部. C, シラカンバの 12 月の前年の木部. 矢印は水が見られない道管を示す. D, オノエヤナギの 12 月の前年の木部. 矢印は水が見られない道管を示す.

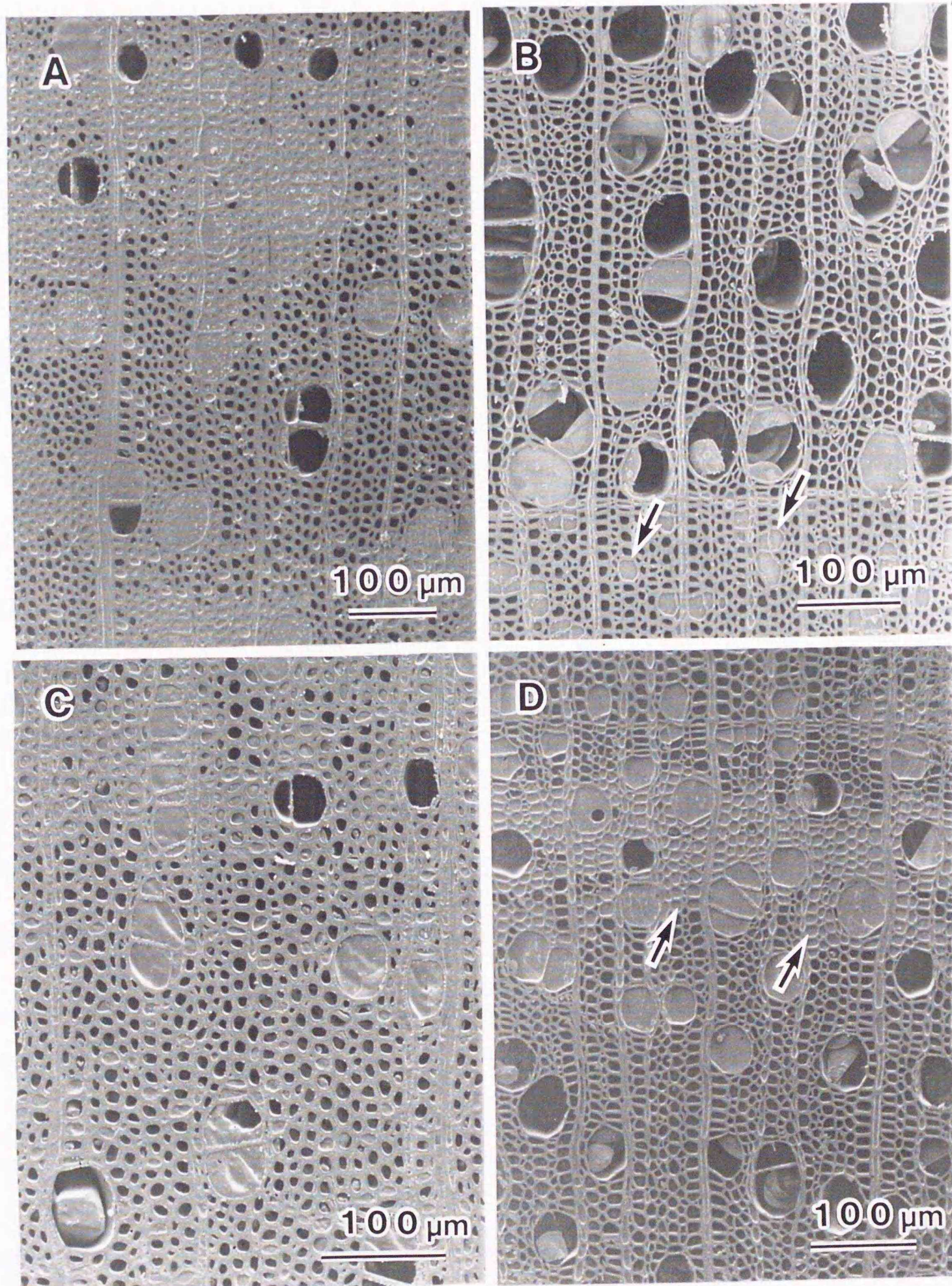


Fig. 4.8 シラカンバおよびオノエヤナギの枝の 1 月と 2 月の Cryo-SEM 写真. 木口面. A, シラカンバの 1 月の前々年の木部. B, オノエヤナギの 1 月の前々年の木部. 矢印は水で満たされている道管を示す. C, シラカンバの 2 月の前々年の木部. D, オノエヤナギの 2 月の前々年の木部. 矢印は水で満たされている木部繊維を示す.

されている道管と内こうに水が認められない道管が存在した (Fig. 4.8C). オノエヤナギの木部でも, 内こうに水が認められない道管と内こうが水で満たされている道管があった. また, 内こうが水で満たされている木部繊維も観察された (Fig. 4.8D, 矢印).

シラカンバとオノエヤナギの枝における木部水分分布の季節変化の模式図を Fig. 4.9 に示す.

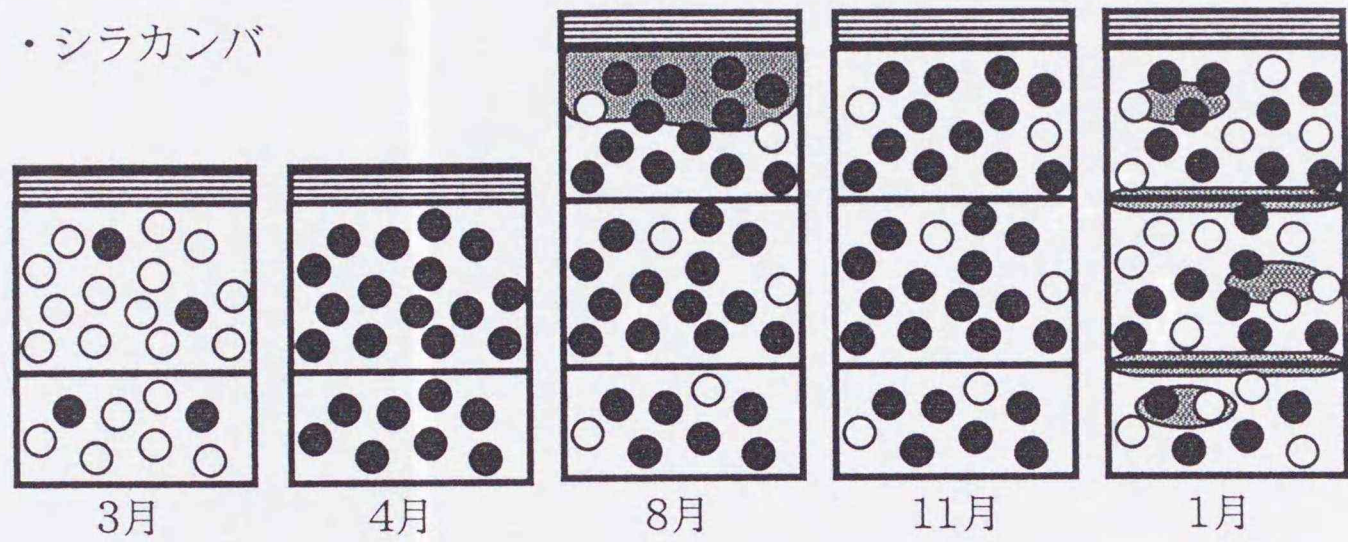
4.3.2 シラカンバの樹幹の木部水分分布の季節変化

シラカンバの樹幹の木部水分分布の季節変化を, Cryo-SEM により観察した. 辺材の外層部として樹皮側より数えて 2 年輪目を, 辺材の中央部として樹皮側より数えて 5, 6 年輪目を, 辺材の内層部として樹皮側より数えて 9~12 年輪目を観察した結果を以下に示す.

3 月に採取した試料では, 樹皮側より数えて 2 年輪目のほとんどの道管の内こうには水が認められなかった (Fig. 4.10A). 多くの木部繊維の内こうにも水が認められなかったが, 年輪境界 (Fig. 4.10B, 小矢印) 付近の木部繊維の内こうは水で満たされていた. 内こうに水が認められない道管には階段せん孔板が観察されるものもあった (Fig. 4.10B, 大矢印). 樹皮側より数えて 5 年輪目では多くの道管の内こうには水が認められなかったが, 6 年輪目では内こうが水で満たされている道管も数多くあった (Fig. 4.10C). また, 6 年輪目の年輪境界 (Fig. 4.10C, 矢印) 付近の木部繊維の内こうに水が観察された. 樹皮側から数えて 9 年輪目では, ほとんどの道管の内こうは水で満たされていた. また多くの木部繊維の内こうには水が見られなかったが, いくつかの木部繊維の内こうは水で満たされていた (Fig. 4.10D, 矢印).

4 月になると樹皮側より数えて 2 年輪目の道管の内こうは水で満たされてお

・シラカンバ



・オノエヤナギ

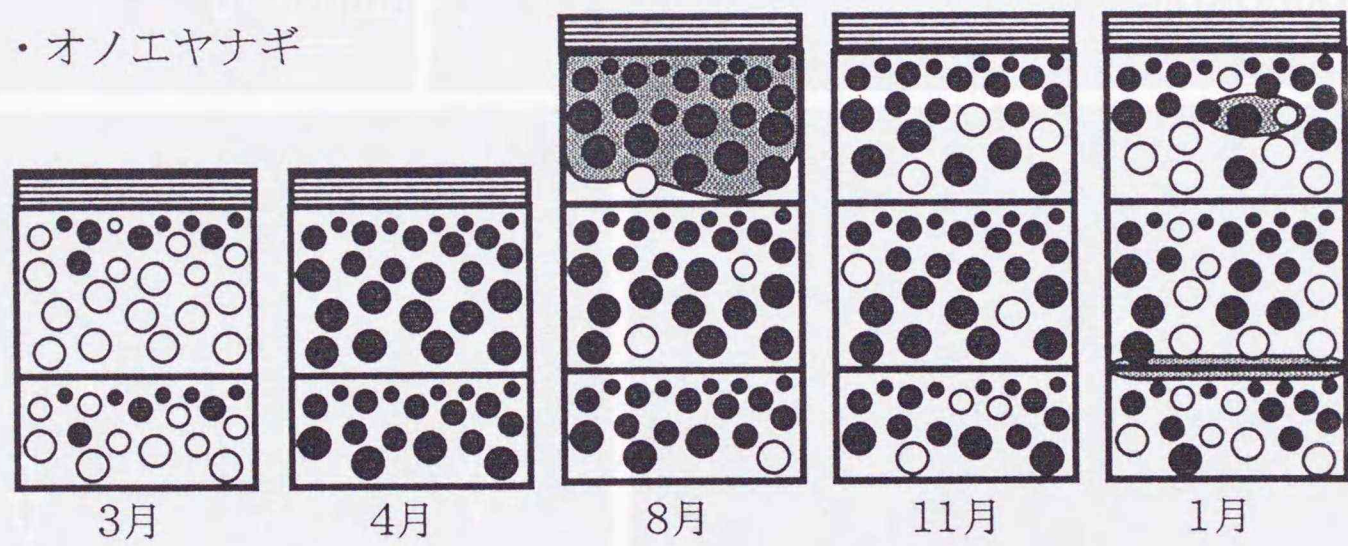


Fig. 4.9 シラカンバとオノエヤナギの枝における木部水分分布の季節変化.

- , 水分が存在した道管.
- , 水分が存在しなかった道管.
- , 水分が存在した木部繊維.
- , 水分が存在しなかった木部繊維.
- ≡, 師部.

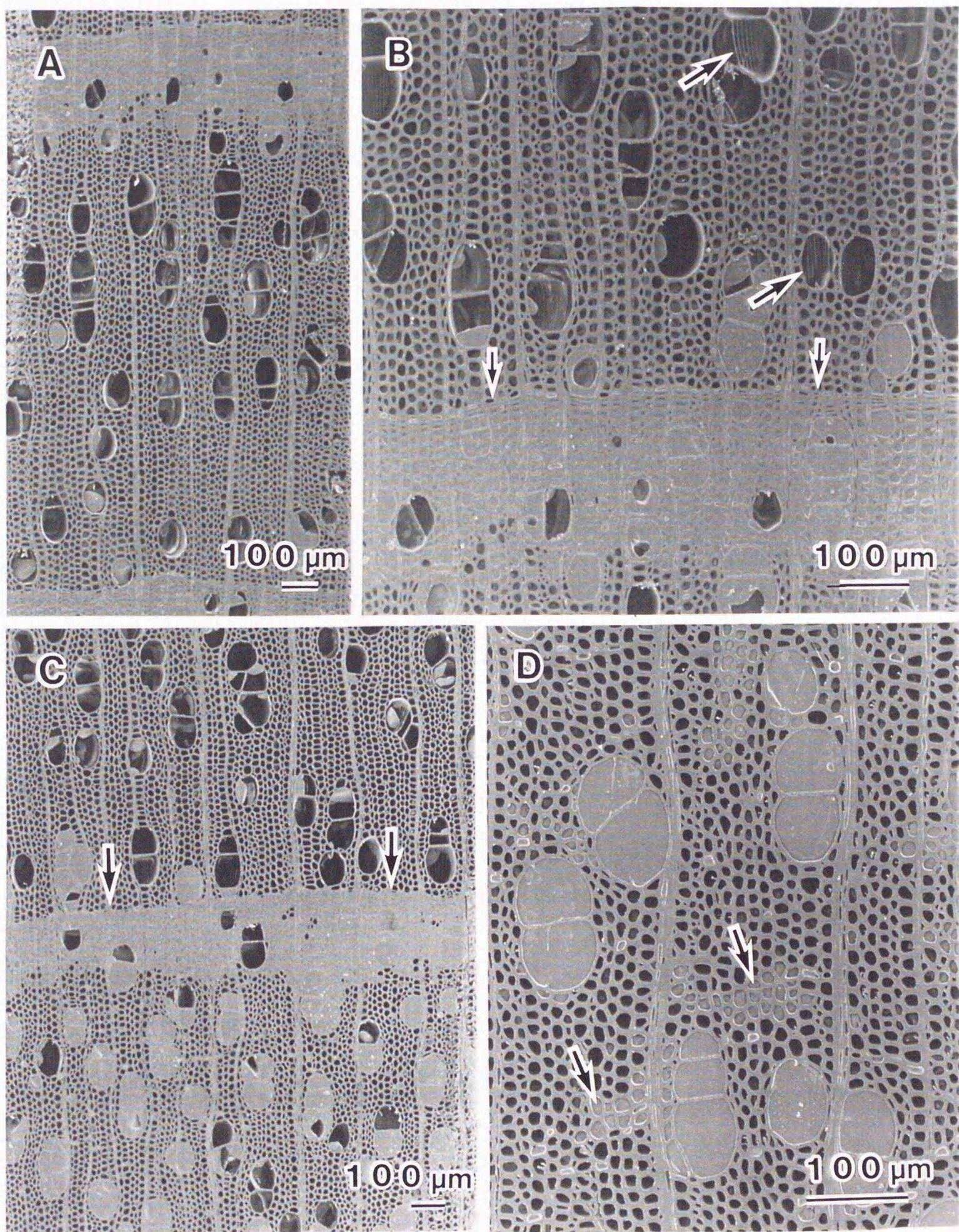


Fig. 4.10 シラカンバの樹幹の 3 月の Cryo-SEM 写真. 木口面. A, 樹皮側から数えて 2 年輪目. B, 樹皮側から数えて 1, 2 年輪目. 小矢印は年輪境界, 大矢印は階段せん孔板を示す. C, 樹皮側から数えて 5, 6 年輪目. 矢印は年輪境界を示す. D, 樹皮側から数えて 9 年輪目. 矢印は水で満たされている木部繊維を示す.

り、多くの木部繊維の内こうも水で満たされていた (Fig. 4.11A). 年輪イニシャル部では内こうに水が認められない木部繊維 (Fig. 4.11B, 矢印) も観察されたが、わずかであった。樹皮側より数えて 5, 6 年輪目でも、すべての道管の内こうが水で満たされていた。また多くの木部繊維の内こうも水で満たされていた。とくに年輪境界 (Fig. 4.11C, 矢印) 付近の木部繊維の内こうは水で満たされていた。樹皮側より数えて 12 年輪目ではすべての道管の内こうが水で満たされていた。また、内こうが水で満たされている木部繊維 (Fig. 4.11D, 矢印) と内こうに水が認められない木部繊維が観察された。

8 月の時点では樹皮側より数えて 2 年輪目のほとんどの道管の内こうは水で満たされていた (Fig. 4.12A). しかし、ほとんどの木部繊維の内こうには水が認められなかった (Fig. 4.12B). 樹皮側より数えて 5 年輪目でもほとんどの道管の内こうは水で満たされていたが、木部繊維の内こうには水が認められなかった (Fig. 4.12C). 樹皮側より数えて 9 年輪目では多くの道管の内こうは水で満たされていたが、いくつかの道管の内こうには水と共に空隙が存在するものも見られた (Fig. 4.12D, 矢印)。

4.3.3 シラカンバの樹幹の染料上昇部位の観察

シラカンバの樹幹における水分通導部位を特定するために、8 月に立木染色を行い染料注入孔から樹軸方向に 0.5m ごとにそれぞれ観察した。染料注入後 1 時間で、1 本の供試木では注入孔上 0.5m の部位まで染色が観察され、もう 1 本の供試木では注入孔上 1.0m の部位まで染色が観察された。以下に注入孔上 1.0m の部位まで染色が観察された供試木の観察結果について述べる。

染料注入部では辺材の樹皮側から髄付近までの広い範囲が染色されていた (Fig. 4.13A). 染色された範囲は染料注入孔と同一方向、同程度の接線方向幅

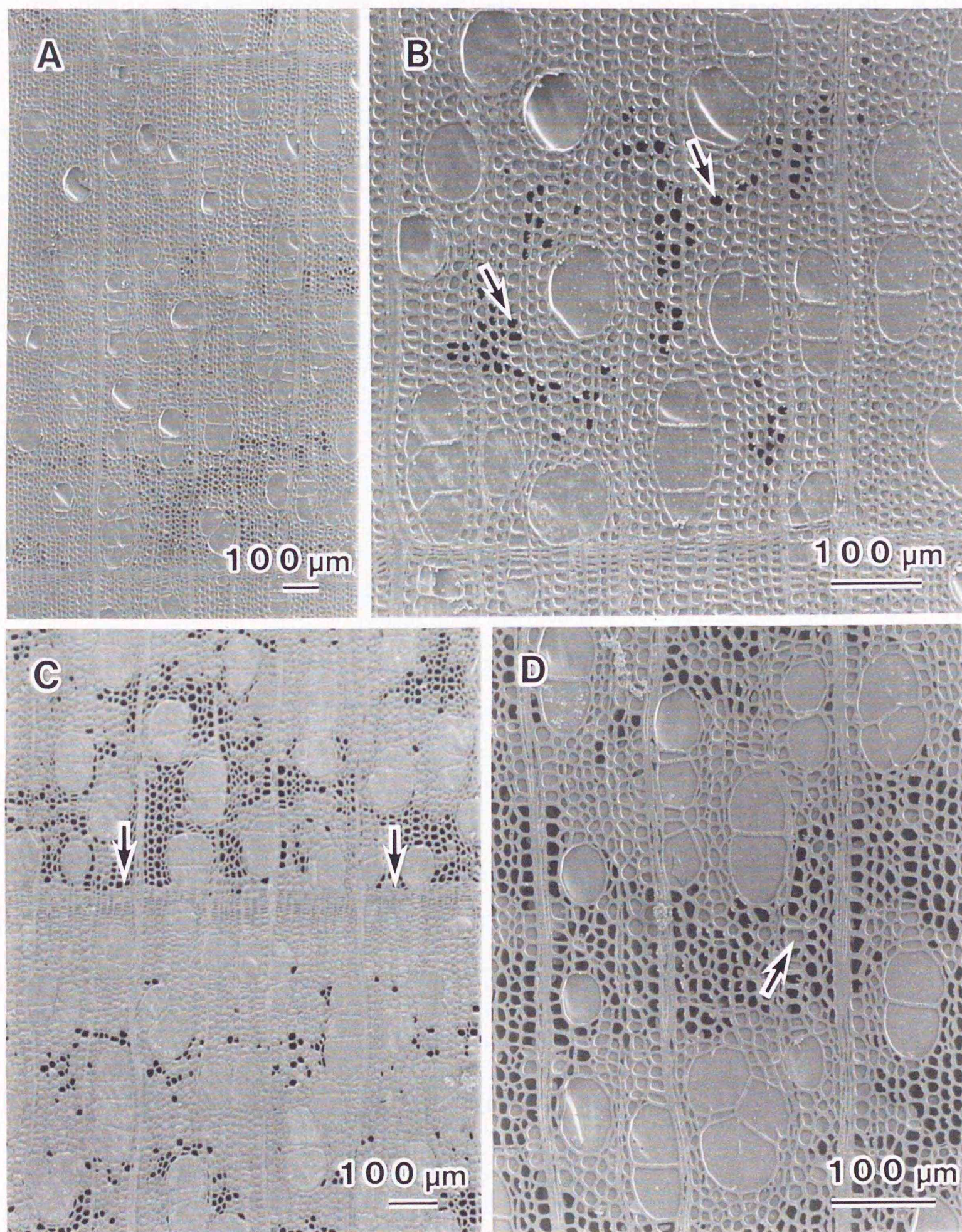


Fig. 4.11 シラカンバの樹幹の 4 月の Cryo-SEM 写真. 木口面. A, 樹皮側から数えて 2 年輪目. B, 樹皮側から数えて 2 年輪目のイニシャル部. 矢印は水が見られない木部繊維を示す. C, 樹皮側から数えて 5, 6 年輪目. 矢印は年輪境界を示す. D, 樹皮側から数えて 12 年輪目. 矢印は水で満たされている木部繊維を示す.

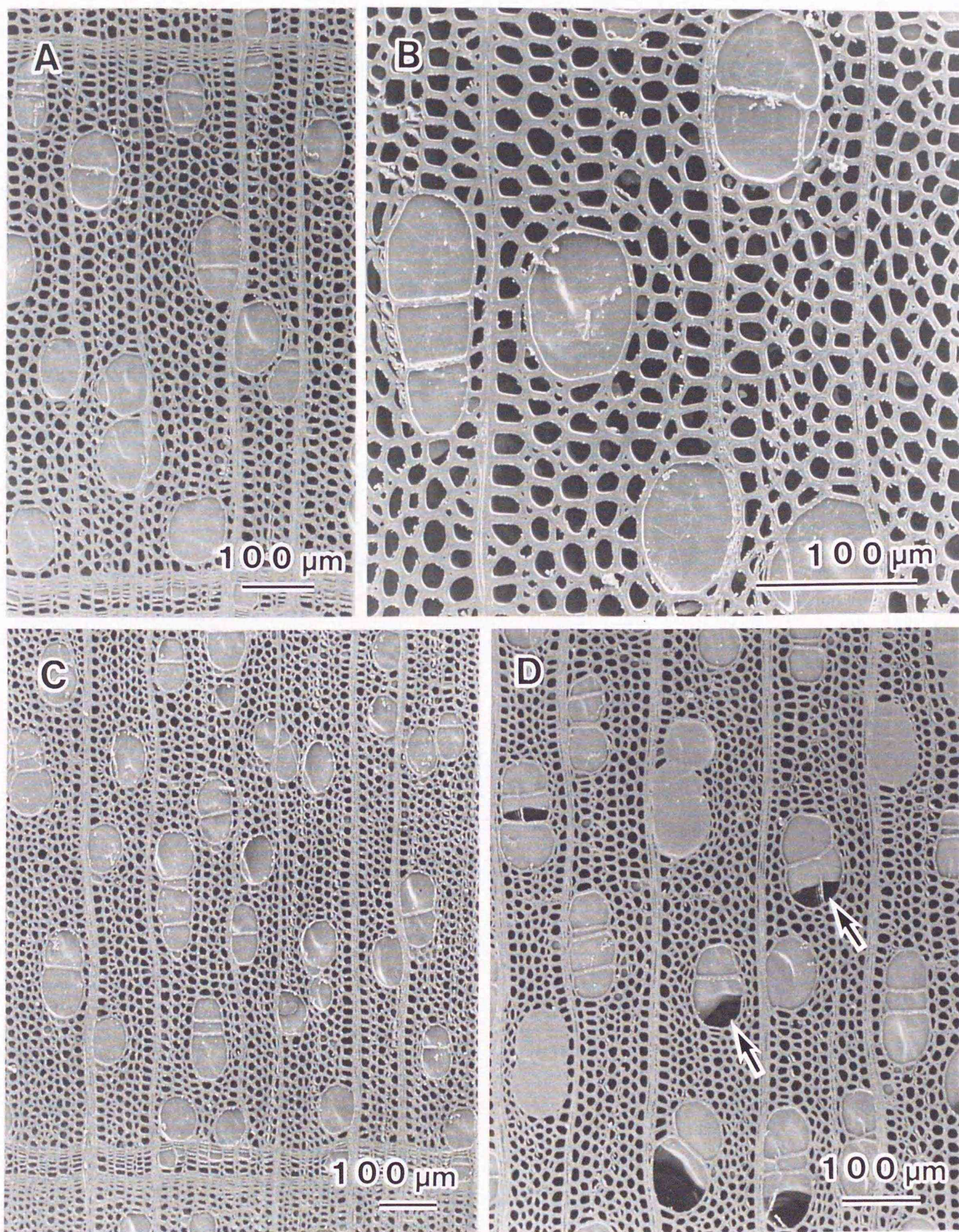


Fig. 4.12 シラカンバの樹幹の 8 月の Cryo-SEM 写真. 木口面. A, 樹皮側から数えて 2 年輪目. B, A の一部の拡大. C, 樹皮側から数えて 5 年輪目. D, 樹皮側から数えて 9 年輪目. 矢印は空隙が見られる道管を示す.

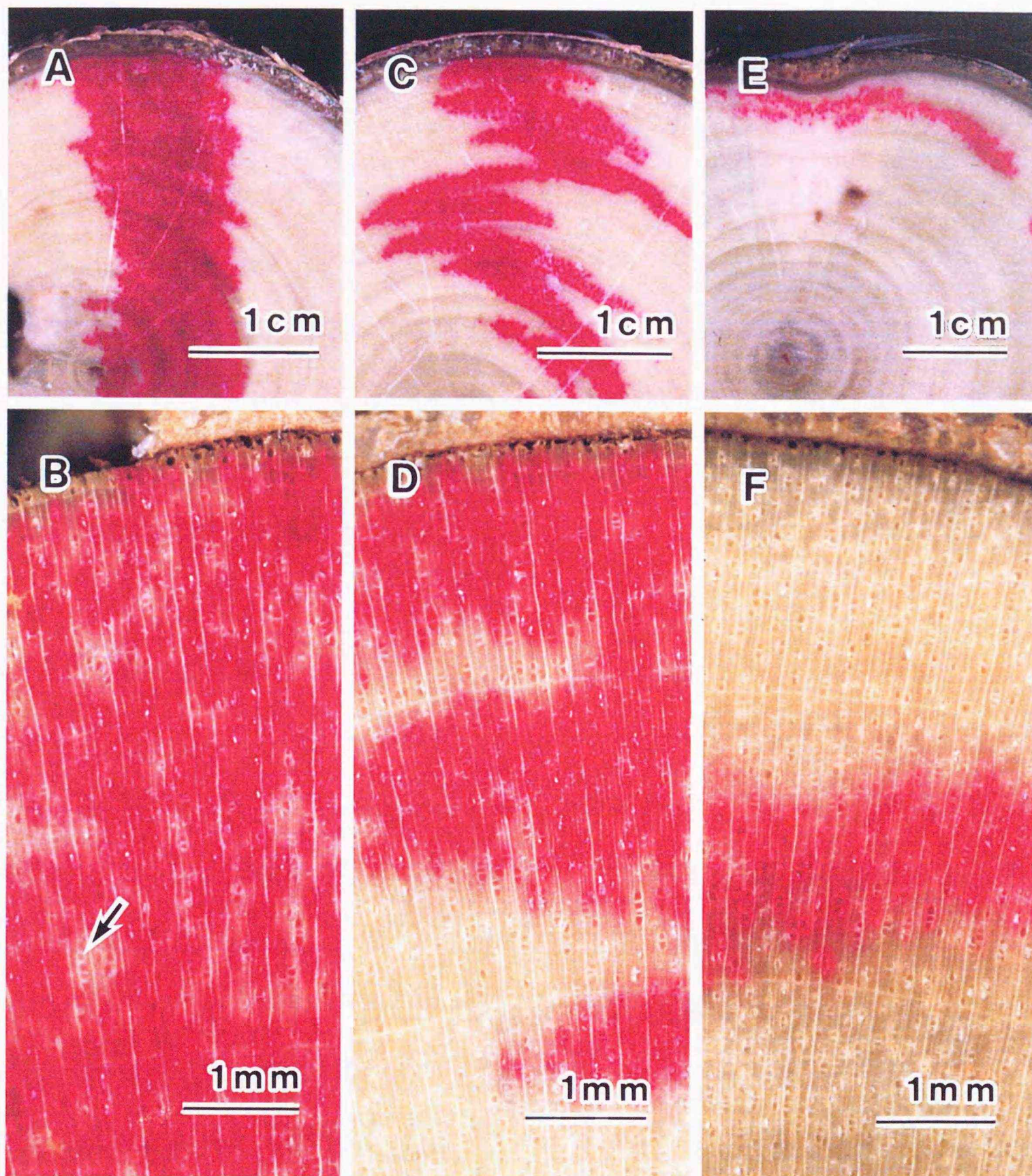


Fig. 4.13 シラカンバの樹幹の 8 月の立木染色写真. 木口面. A, 染料注入部の木部. B, 染料注入部の辺材外層部. 矢印は染色されていない道管を示す. C, 注入孔上 0.5m の木部. D, 注入孔上 0.5m の辺材外層部. E, 注入孔上 1.0m の木部. F, 注入孔上 1.0m の辺材外層部.

であった。多くの道管や道管周囲の組織に強い染色が観察されたが、染料注入孔の樹軸方向上部の木部でも染色されていない道管が存在した (Fig. 4.13B, 矢印)。注入孔上 0.5m では、木部の染色された領域が、注入孔の幅 (8mm) よりも接線方向に広がっていた (Fig. 4.13C)。樹皮側から数えて 10 年輪目までが染色されていた。また、せん孔部と同一方向の樹軸方向上部の木部でも道管とそれらの周囲の組織が染色されている領域と染色がみられない領域がそれぞれ観察された (Fig. 4.13D)。注入孔上 1.0m の部位では、樹皮側から数えて 1, 2 年輪目のみに染色が見られた (Fig. 4.13E)。いくつかの道管とそれらの周囲の組織に染色が見られた (Fig. 4.13F)。

4.3.4 気温および地温

シラカンバとオノエヤナギの枝におけるキャビテーションと凍結ストレスとの関係を検討するために気温と地温の季節変化を調べた。北海道大学農学部附属農場における 1996 年の春期から翌 1997 年の春期までの日最高気温、日最低気温、地温の変化を Fig. 4.14 に示す。最初に日最低気温が氷点下を記録したのは 10 月下旬で、最初に日最高気温が氷点下を記録したのは 11 月中旬であった。これは 11 月の試料採取の 2 日前であった。12 月から 3 月にかけては日最低気温が氷点下の日が続き、 -10°C 以下の日が 12 日間記録された。地温は氷点下になることはなかった。

4.4 考察

シラカンバとオノエヤナギの枝の Cryo-SEM 観察では、樹皮側から数えて 1, 2 年輪目では 1 月から 3 月にかけて空隙が存在した道管の割合が時間の経過とともに増加した。11 月と 12 月の観察時には多くの道管の内こうが水で満

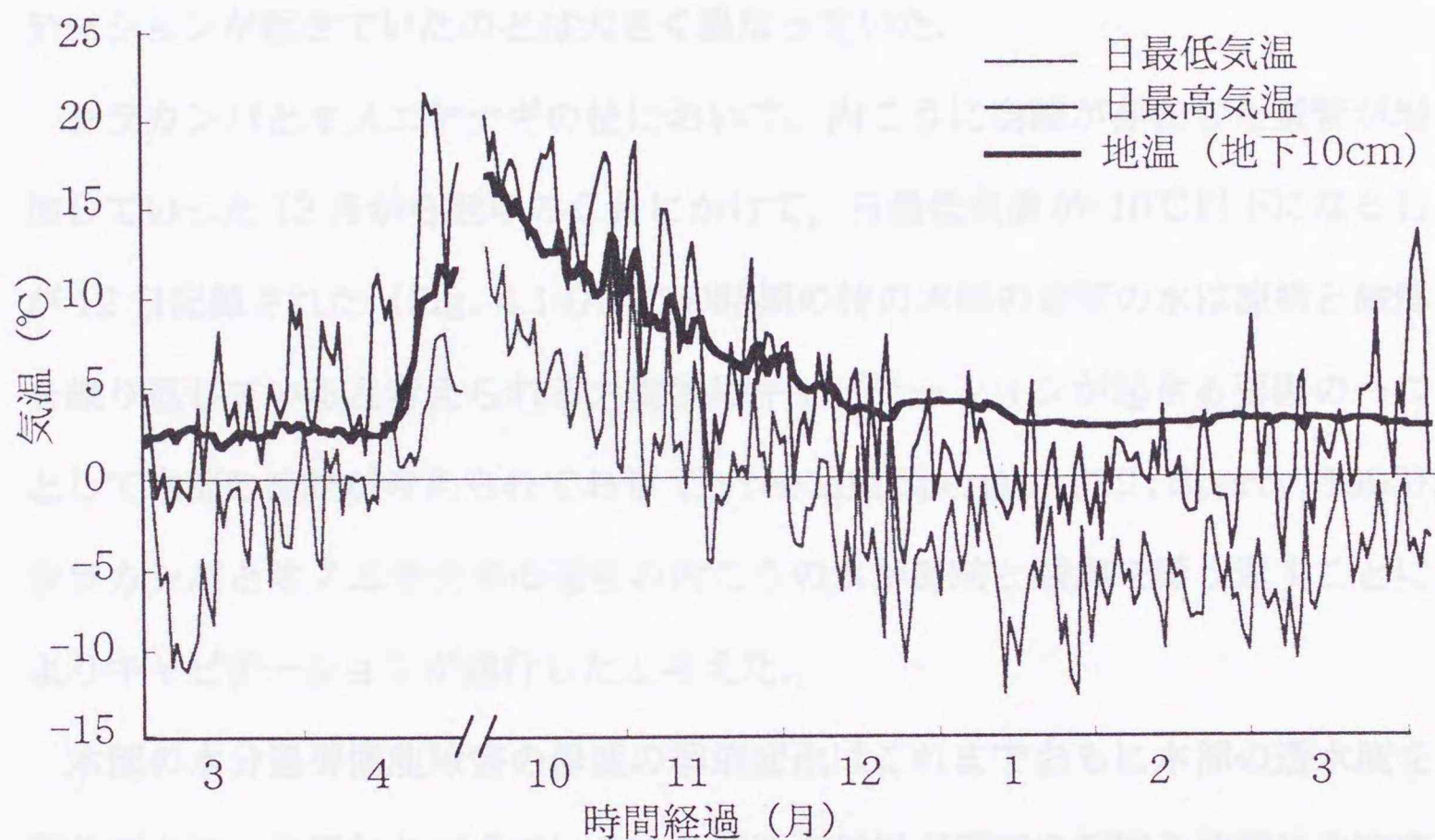


Fig. 4.14 1996年3月から1997年3月にかけての北海道大学農学部附属農場における日最高気温と日最低気温、および地温（地下10cm）の変化.

たされていた (Fig. 4.7) のに対して、3月の観察時には多くの道管の内こうには空隙が存在していた (Fig. 4.1, 4.2)。このような時間の経過に伴い空隙が存在した道管の割合が徐々に増加する傾向は、第3章で述べた環孔材樹木であるヤチダモの孔圈道管において秋期から冬期にかけての一時期に一斉にキャビテーションが起きていたのとは大きく異なっていた。

シラカンバとオノエヤナギの枝において、内こうに空隙が存在した道管が増加していった12月から翌年の3月にかけて、日最低気温が -10°C 以下になる日が12日記録された (Fig. 4.14)。この時期の枝の木部の道管の水は凍結と融解を繰り返していると考えられる。樹木にキャビテーションが起きる要因の一つとして木部の凍結が考えられており (Tyree and Sperry, 1989; Sperry, 1993), シラカンバとオノエヤナギの道管の内こうの水が凍結と融解を繰り返すことによりキャビテーションが進行したと考えた。

木部の水分通導機能障害の程度の季節変化はこれまでおもに木部の透水性を測ることにより行われてきている。冬期間の気温が零度を下回る地域に生育する広葉樹においては冬期間に木部の透水性が低下することが報告されている (Sperry and Sullivan, 1992; Magnani and Borghetti, 1995; Pockman and Sperry, 1997)。透水性の低下の程度は樹種によりさまざまであるが、一般に冬期に見られる透水性の低下の程度は環孔材樹木の方が散孔材樹木よりも大きい (Sperry, 1993; Hacke and Sauter, 1996a)。また、環孔材樹木の木部では、秋期から冬期にかけての最初に気温が零度を下回った後に透水性が著しく低下することも報告されている (Cochard and Tyree, 1990; Cochard et al., 1992; Sperry and Sullivan, 1992; Sperry et al., 1994)。

このような凍結ストレスに対する透水性の低下が樹種により異なるのは、通水要素の細胞径が関係していると考えられている (Tyree et al., 1994)。Ewers

(1985) はさまざまな直径のガラス管中に空気を溶解した水を入れて凍結と融解を施した際の凍結により生じた気泡の安定性について報告している。それによると、針葉樹の早材仮道管と同程度の小径のガラス管内の水を凍結して融解させると、凍結により生じた気泡は氷の融解後すぐに水に溶解してしまう。これに対して、環孔材樹木の孔圏道管ほどの大径のガラス管内の水を凍結させて気泡を生じさせた後に融解させるとその気泡は小径のガラス管の場合と比べて長い間融解せずに残存する。Sperry et al. (1994) は通水要素の径が小さいほどキャビテーションが起きにくいことを報告している。

本章においても、3月のオノエヤナギの枝の Cryo-SEM 観察の結果では樹皮側から数えて 1, 2 年輪目の木部の約 70% の道管に空隙が見られたが、年輪ターミナル部付近の小径の道管の多くでは、内こうが水で満たされていた (Fig. 4.2A)。小径の通水要素は凍結によるキャビテーションを起こしにくいと考えられる。これに対してシラカンバでは道管径とキャビテーションとの間に明瞭な関係は認められず、空隙が存在していた道管は年輪内に散在していた (Fig. 4.1A)。オノエヤナギの道管は単せん孔をもち (Fig. 4.5C)、孤立管孔が多い (Fig. 4.2) ので、道管は比較的単純な管として考えられ道管径とキャビテーションとの関係が明瞭にあらわれると考えられる。一方、シラカンバの道管は階段せん孔板をもち (Fig. 4.1B, 4.4C, 4.10B)、さらに放射複合管孔や集団管孔が多く、道管の横断面形も変化にとんでいる。したがって、シラカンバの道管を単純な管として考えることには無理があり、道管径とキャビテーションとが必ずしも関連しないと考えられる。

Cryo-SEM 観察からシラカンバとオノエヤナギの枝の道管が水で再び満たされる時期が明らかになった。両樹種共に樹皮側から数えて 1, 2 年輪目において、3月まで多くの道管の内こうにあまり水が見られなかった (Fig. 4.1, 4.2)

のに対して、4月のまだ開葉していない時期にほとんどの道管の内こうは水で満たされた (Fig. 4.4, 4.5). また、シラカンバの樹幹の樹皮側から数えて1, 2年輪目においても同時期に道管の内こうが水で満たされていた (Fig. 4.11A, B) のが観察された. 開葉前の時期に木部の透水性が上昇することはカバノキ属やカエデ属の樹種で報告されており (Sperry et al., 1988c; Sperry, 1993; Hacke and Sauter, 1996a), 木部で測定される正の圧力が透水性の上昇に関与していると考えられている.

木部で測定される正圧のなかで、根の能動的吸水に由来すると考えられる根圧は通水系が春に水分通導機能が回復する際に重要な役割を果たすと考えられている (Scholander et al., 1965; Sperry et al., 1987; Sperry et al., 1994). 木部における正圧がマンノメーターにより測定されている樹種は多数あり、ラブルスカブドウ (Scholander et al., 1955), リパリアブドウ (Sperry et al., 1987), ニグラカンバ (*Betula nigra* L.) (Kramer and Kozlowski, 1960), ルテアカンバ, レンタカンバ (*Betula lenta* L.) (Merwin and Lyon, 1909), オクシデントカンバ, パピリフェラカンバ, インカーナハンノキ (*Alnus incana* (L.) Moench) (Sperry et al., 1994) で報告されている.

道管の内こうに存在していた気体は根圧により加圧された樹液に溶解するか、道管外に押し出されてしまい、水分通導機能が回復するのだろうと考えられている (Sperry et al., 1987). しかし、これまでに報告されている根圧の値は、オクシデントカンバで約 120kPa, パピリフェラカンバで約 60kPa, インカーナハンノキで約 30kPa であり (Sperry et al., 1994), 樹高が 100m 以上にもなる樹木の樹冠部まで水を移動させるのに十分ではないという指摘もある (Steudle, 1995). 加えて、マンノメーターによる測定では正圧が検出されなかった針葉樹において冬期と比較して春期に透水性が上昇することが報告されて

いる (Sperry, 1993) ことから水分通導機能の回復と根圧との関係は未だ不明である。

両樹種において成長期間中, Cryo-SEM により当年の木部繊維の内こうに水もしくは原形質が観察された (Fig. 4.6). 水もしくは原形質が観察された木部繊維は年輪のターミナル部に多く, 年輪のイニシャル部の木部繊維の内こうには水が見られないものが多かった. 11 月になると, 両樹種において内こうに水もしくは原形質が観察された木部繊維は形成層帯付近に限定された. このような当年の木部における木部繊維の内こうから季節の推移とともに水分が消失していく現象は, 環孔材樹木のヤチダモでも観察されている (第 3 章). ヤチダモの場合, 成長期の当年の木部の Cryo-SEM 観察と原形質を染色した切片の光学顕微鏡観察から, 木部繊維の内こうの水分の多くは原形質であると結論した. 本章におけるシラカンバとオノエヤナギの枝の Cryo-SEM 観察でも同様に当年に形成された木部繊維の内こうに見られた水分の多くは原形質であり, 木部繊維の成熟とともに消失していったと考える.

シラカンバの樹幹の Cryo-SEM 観察からは, 前年および前々年の木部の道管にほとんど水が見られない 3 月の試料においても, 樹皮側から数えて 6 年輪目では多くの道管の内こうに水が存在し, 樹皮側から数えて 9 年輪目のほとんどの道管では内こうが水で満たされていた (Fig. 4.10). さらに 4 月になると辺材のすべての道管に水が充満していたのに加えて, 多くの木部繊維の内こうに水が満たされていた (Fig. 4.11). 辺材内層部の道管の内こうの水は成長期間中である 8 月においても保持されており (Fig. 4.12), シラカンバの樹幹においては, 辺材内層部の道管は 1 年間を通じて内こうが水で満たされている可能性がある. 札幌で越冬している樹木は, 日中, 樹幹の南側が数時間融解するほかはほとんど凍結状態であることが報告されている (酒井と和田, 1963; 酒

井, 1965). シラカンバにおいて凍結と融解により道管のキャビテーションが起きると仮定すると, 札幌市より北に位置している美深町に生育していたシラカンバの樹幹では冬期間, 辺材の外層部が凍結と融解を繰り返している間も辺材内層部は凍結したままであり, キャビテーションが起きる道管が少ないことが考えられる.

シラカンバの樹幹において成長期間中に立木染色を行ったところ, 辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲の道管とそれらの周囲の組織が, 染料注入後 1 時間で注入孔上 0.5m の部位まで染色されていた (Fig. 4.13). シラカンバのような散孔材樹木では, 少なくとも樹皮側から数えて数年輪の道管で水分通導が行われるとこれまでも報告されてきた (Greenidge, 1957b ; Kozlowski and Winget, 1963) が, この実験においてもそれが確認された. 4 月に水で満たされていた前年以前の木部の道管が, 成長期間中の水分通導の役割を果たしていることが明らかになった.

本章では散孔材樹木であるシラカンバとオノエヤナギの木部水分分布の季節変化を Cryo-SEM を用いて検討した. シラカンバの樹幹では立木染色による観察も行った. Cryo-SEM による観察の結果, 両樹種の前年および前々年の木部では開葉前の 3 月の観察時には多くの道管の内こうにほとんど水が存在していなかったが, 4 月の観察時にはシラカンバにおいてはすべての道管の内こうが, オノエヤナギにおいてはほとんどの道管の内こうが水で満たされていた. シラカンバの樹幹では樹皮側から数えて 3 年輪目以降の木部の道管も含めて同様の現象が観察された. これらは開葉前の時期の現象であり, カバノキ属を含むいくつかの広葉樹においてこれまで報告されている木部の正圧が, 道管の内こうが水で再充填されることに関与することが考えられる. しかし, 木部の正

圧がマノメーターにより測定されなかった樹種においても透水度が春期に上昇することが報告されており、オノエヤナギの道管の内こうが水で満たされた要因を特定することができなかった。また、成長期間中、両樹種において当年および前年の木部の多くの道管の内こうは水で満たされていた。立木染色による観察では染料注入部より上部で辺材の外層部から内層部にかけての広い範囲で道管とそれらの周囲の組織に染色が見られ、春期に水で満たされた道管が成長期間中の水分通導を行っていると考えられた。また、Cryo-SEMにより両樹種において1月から3月にかけて空隙が存在していた道管の割合が徐々に増加するのが観察された。このように、散孔材樹木であるシラカンバとオノエヤナギの水分通導機能障害の発生と水分通導機能障害からの回復は、第3章で述べた環孔材樹木のヤチダモのそれと大きく異なることが明らかになった。

第5章 凍結・融解処理によるヤチダモの孔圏道管のキャビテーション

5.1 はじめに

キャビテーションが樹木の通水系に起こる原因として水ストレスと木部の凍結が考えられている (Tyree and Sperry, 1989 ; Sperry, 1993) . 第3章で述べたように, 環孔材樹木であるヤチダモの木部の水分分布の季節変化を Cryo-SEM により観察した結果と立木染色の結果から, ヤチダモの当年の孔圏道管は秋期から冬期にかけてキャビテーションを起こし, 翌年の春期になってもこれら孔圏道管が水分通導機能を回復しないことが明らかになった. ヤチダモの当年の孔圏道管にキャビテーションが進行した時期には供試木は落葉していることから, 蒸散による水ストレスがキャビテーションの原因とは考えにくい. また, 第3章で気温データを検討したところ, 15 年生ヤチダモの当年の孔圏道管にキャビテーションが起きる前に気温が氷点下になっていたことが分かった. これまで, 通水系内の水に溶解していた気体が, 凍結する際に水に対する気体の溶解度と氷に対する空気の溶解度の違いから気泡として氷中に形成され, 通水系内の氷の融解後に気泡が残存したまま通水系内に張力が働くと, 気泡が拡大してキャビテーションが起きるという仮説が考えられている (Zimmermann, 1983 ; Sperry, 1993) . したがって, 15 年生ヤチダモでも木部の凍結によりキャビテーションが進行したのではないかと考えられた.

しかし, 第3章で述べたように 3, 4 年生ヤチダモを用いた実験では, 同様の時期に当年の孔圏道管にキャビテーションが起きていたのが観察されたものの, 気温の氷点下への低下とキャビテーションの進行に明確な関係を見い出すことができなかった. 自然条件下では, 木部の凍結とキャビテーションの関係を検討するためには外気温の変動に依存せざるを得ない. 木部の凍結とキャビテーション

の関係を解明するためには温度条件を人工的に調節し、当年の木部を確実に凍結させて当年の孔圏部における水分の挙動を実験的に明らかにする必要がある。

樹木に人工的に凍結ストレスを与えて水分通導の変化を調べる研究はこれまでも行われている。Hammel (1967) はカナダツガの採取した枝を凍結させた後に融解させたところ再び吸水が起きたと報告している。これに対して Langan et al. (1997) はラウリナウルシ (*Rhus laurina* Nutt.) と *Ceanothus megacarpus* Nutt. の採取した枝の基部を水で満たした容器に入れ、枝の上部を -20°C まで冷却した後に融解させて凍結前後で透水性に差があるかどうかを検討し、両樹種において凍結・融解処理後に透水性は減少したと報告している。また、冬期間の気温が氷点下になる地域に生育する環孔材樹木の本部では秋期から冬期にかけて最初に気温が零度を下回った後に透水性が著しく低下したことも報告されている (Cochard and Tyree, 1990 ; Cochard et al., 1992 ; Sperry and Sullivan, 1992 ; Sperry et al., 1994 ; Hacke and Sauter, 1996a) 。

しかし、冬期間の気温が氷点下になる地域に生育する環孔材樹木の本部が氷点下の温度にさらされて透水性が低下した時の、道管の内こうの水の量や存在領域は明らかになっていない。透水性が低下する原因としては通水系にキャビテーションが起きることが考えられているが、環孔材樹木において水分通導を行っていたすべての道管にキャビテーションが起きるのかということや、キャビテーションが起きない道管が存在する場合には、キャビテーションと道管の径や年輪内での部位に関係があるのかということに関する知見も乏しい。また、本部の凍結により道管の内こうにキャビテーションが起きると仮定して、キャビテーションが本部の凍結時に起きるのか、それとも凍結後の融解時に起きるのかといった点や、キャビテーションの進行過程や、空隙が道管の内こう全体に広がるのに要する時間、空隙の形成後の道管の内こうの水の量や存在領域に関しては不明である。

そこで本章では、ポットに植栽した 4 年生のヤチダモを立木状態で人工的に凍結させた後に融解させ、その過程で道管にキャビテーションが起こるかどうかを Cryo-SEM により検討し、凍結に起因するキャビテーションの進行過程をさらに詳しく検討した。また、第 3 章において 15 年生ヤチダモの当年の孔圏道管の内こうからほとんど水が消失していた時期に孔圏道管周囲の木部繊維の内こうは水で満たされていたが、3, 4 年生ヤチダモを用いた実験からは、そのような観察結果は必ずしも明らかではなかった。そこで当年の孔圏道管にキャビテーションが進行する時に道管の内こうの水がどこに移動するのかを明らかにするために、3, 4 年生のヤチダモの当年の孔圏道管に蛍光染料を吸引させた後、人工的に凍結・融解処理を行い、木部内での蛍光染料の移動の経路や範囲を CLSM 法により観察した。さらに、ポットに植栽したヤチダモを秋期に外気温が氷点下まで低下する以前に温室に移動して生育させることにより、凍結ストレスを与えない場合に木部水分分布が冬期から春期にかけてどのように変化するかを Cryo-SEM により観察した。

5.2 実験方法

5.2.1 供試木

北海道大学農学部附属演習林苗畑（札幌）に植栽されていた樹高約 2m、地上高 80cm の部位での直径約 2cm の 3, 4 年生のヤチダモを供試木として用いた。

5.2.2 凍結・融解処理

ポットに植栽された 36 本の 4 年生の苗木を供試木として使用した。供試木がほとんど落葉し、当年の木部が氷点下の温度を経験していない 11 月に実験を行った。

まず、苗畑にて 4 本の供試木の幹を第 2 章の 2.2.2 に準じて立木液体窒素凍結法により採取しコントロールとした。ついで 32 本のポットに植栽された供試木を -20°C の低温室に移動させ、30 分間凍結させた。この温度は一般に木部の柔細胞以外の細胞の内こうや細胞外の空隙にある水が凍結すると考えられている温度より低い (Zimmermann, 1964, 1983 ; 黒田, 1998) 。また、予備実験により別の 4 年生の供試木の幹の辺材部に温度センサーを差し込んで同様の処理を施して温度変化を記録したところ、柔細胞以外の細胞の内こうや細胞外の空隙にある水の凍結による発熱に起因すると考えられる木部の温度上昇が、実験開始 10~15 分後に -3°C から -6°C まで過冷却している最中に起きた。この処理により木部は十分凍結していると考えられる。

低温室に供試木を移動させてから 30 分後に 4 本の供試木から低温室で第 2 章の 2.2.2 に準じた液体窒素凍結法により試料を採取し、凍結試料とした。続いて、直ちに残りの 28 本の試料を低温室から $+20^{\circ}\text{C}$ の部屋に移動させ、これ以降 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 時間後に、それぞれ 4 本ずつの供試木から立木液体窒素凍結法により試料を採取した。

さらに凍結・融解処理時における木部内の水の移動距離・方向を検討するために、上の処理で凍結試料とした 4 本の供試木から計 14 本の 15cm 長の幹試料を採取した。防水のためにそれらの両端の切断面をワセリンとパラフィルムで覆った後、低温室から $+20^{\circ}\text{C}$ の部屋に移動させ、前述のポット植栽供試木と同様に、1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 時間後にそれぞれ 2 本の幹試料を液体窒素中に凍結保存した。以上の凍結・融解処理過程を Fig. 5.1 に示す。

これら採取した試料から第 2 章の 2.2.2 に準じて、Cryo-SEM 用の試料を製作し、観察を行った。

また、当年の孔圏道管における空隙が存在していた道管の割合が、凍結・融解

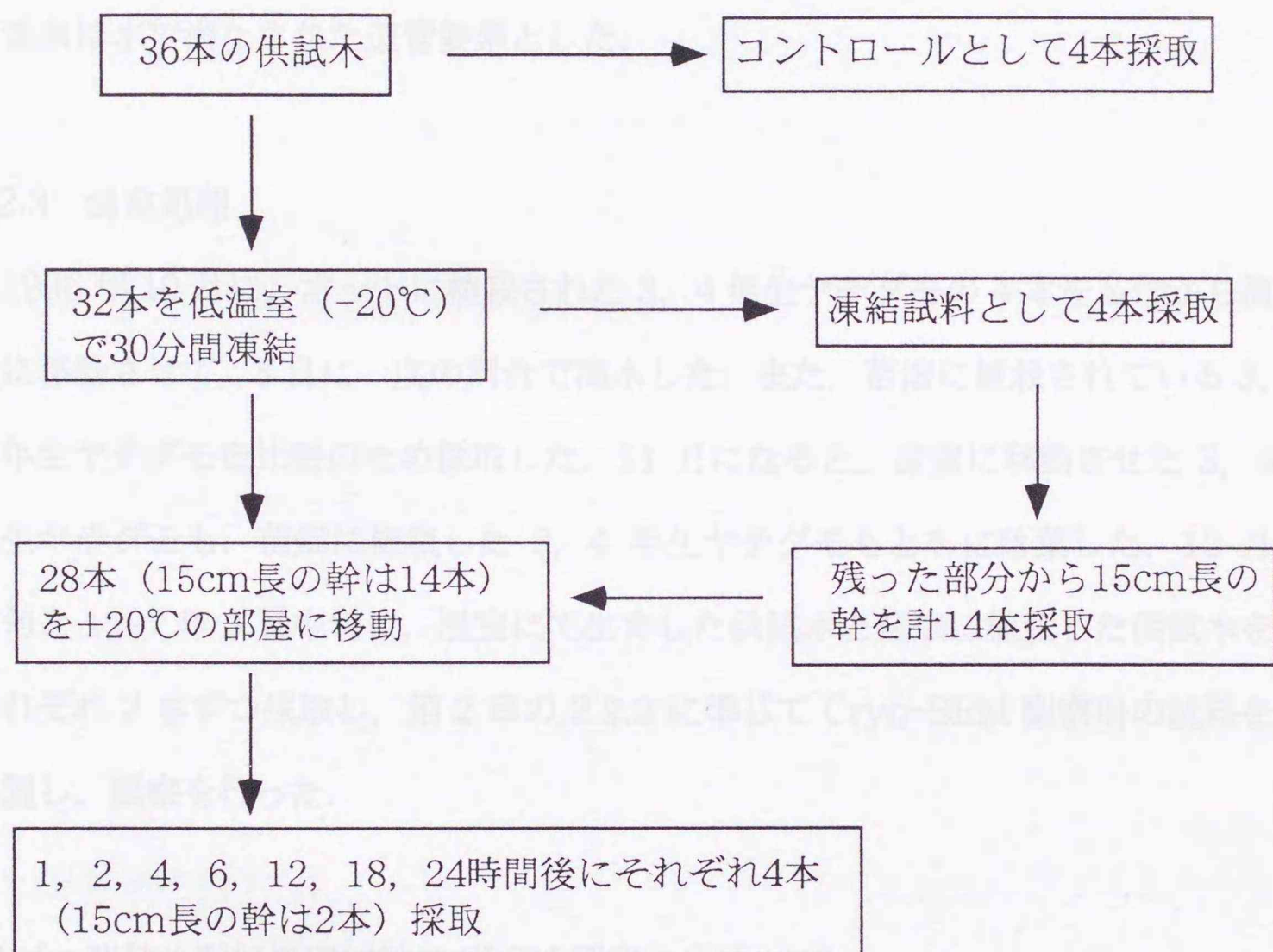


Fig. 5.1 供試木の凍結・融解処理過程.

処理によりどのように変化したかを定量化するため、110 倍以上に拡大された木口面の SEM 写真を用いて各採取時につき 50 個以上の当年孔圏道管（内この接線径が $50\mu\text{m}$ 以上のもの）を選び、水で満たされている道管要素と接線径が $20\mu\text{m}$ 以上の空隙が存在する道管要素を写真上でそれぞれ数え、空隙が存在していた道管の割合を決定した。なお、接線径が $20\mu\text{m}$ 未満の空隙が存在した道管要素は水で満たされた道管要素とした。

5.2.3 温室処理

1996 年 10 月に、ポットに植栽された 3, 4 年生ヤチダモの 4 本を苗畑から温室に移動させて、3 日に一度の割合で灌水した。また、苗畑に植栽されている 3, 4 年生ヤチダモを比較のため採取した。11 月になると、温室に移動させた 3, 4 年生ヤチダモも、苗畑に植栽した 3, 4 年生ヤチダモもともに落葉した。12 月上旬と 1997 年 3 月中旬に、温室にて生育した供試木と苗畑に植栽した供試木をそれぞれ 2 本ずつ採取し、第 2 章の 2.2.2 に準じて Cryo-SEM 観察用の試料を作製し、観察を行った。

5.2.4 凍結・融解処理試料の CLSM 観察

苗畑に植栽されていた 3, 4 年生のヤチダモを用い 12 本を供試木として使用した。供試木が開葉していた 6 月から 10 月の間に試料の採取を行った。苗畑で手鋸を用いて供試木を根元から伐採した後、直ちに元口を水面下で切削した。続いて 0.1% FITC 水溶液もしくは 0.1% ローダミン B 水溶液中に元口を入れ、1 時間放置した。その後、染料の上昇した部位を 10cm 長に切断し、両端をワセリンとパラフィルムで密封して防水した。1 本の供試木から試料片を 8 個採取し、そのうち 4 個をコントロールとして常温下で放置し、残りの 4 個は、 -20°C のフ

レーザーに 30 分以上入れて凍結させた後、常温の室内に移動させて融解させた。融解処理はそれぞれ 2, 6, 12, 24 時間施した。処理後は、約 0.5mm 厚の木口面のハンドセクションを作製し、直ちに CLSM (LSM-310 ; Zeiss) を用いて観察を行い、融解処理試料と同じ時間常温下で放置しておいたコントロールと比較した。CLSM による観察時には、木口面切片に対して垂直方向に $1\mu\text{m}$ ないし $2\mu\text{m}$ 間隔で連続的に約 10~20 枚の光学的切片を得て、TIFF 形式の画像ファイルとして 3.5 インチ光磁気ディスクに保存した。励起光は FITC による染色にはアルゴンイオンレーザー (波長 488nm) を、ローダミン B による染色にはヘリウムネオンレーザー (波長 543nm) を用いた。光学的切片から付属のソフトウェアを用い、重ね合わせ像を構築した (船田, 1997)。

5.3 結果

5.3.1 凍結・融解処理試料の当年孔圏部の水分分布の変化

ポットに植栽した供試木に凍結・融解処理を施し、Cryo-SEM により観察した。

凍結処理を施す前に、苗畑にて採取したコントロールの試料では、当年の孔圏道管の内こうが水で満たされていた (Fig. 5.2A)。また、当年の孔圏道管の内こうの水は、Cryo-SEM では氷の状態で観察されるが、この内こうの水には小さな気泡が含まれていた (Fig. 5.2B, 矢印)。当年の孔圏部を板目面から観察した場合でも同様に、孔圏道管の内こうは水で満たされていたが (Fig. 5.2C, v), 小さな気泡が観察された (Fig. 5.2D, 矢印)。530 倍から 2660 倍に拡大された SEM 写真上で観察を行ったところ、気泡の直径は $0.2\sim 6\mu\text{m}$ であり、多くの気泡の直径は $1\mu\text{m}$ 以下であった。

凍結処理を施した試料においても同様に、当年のほとんどの孔圏道管の内こう

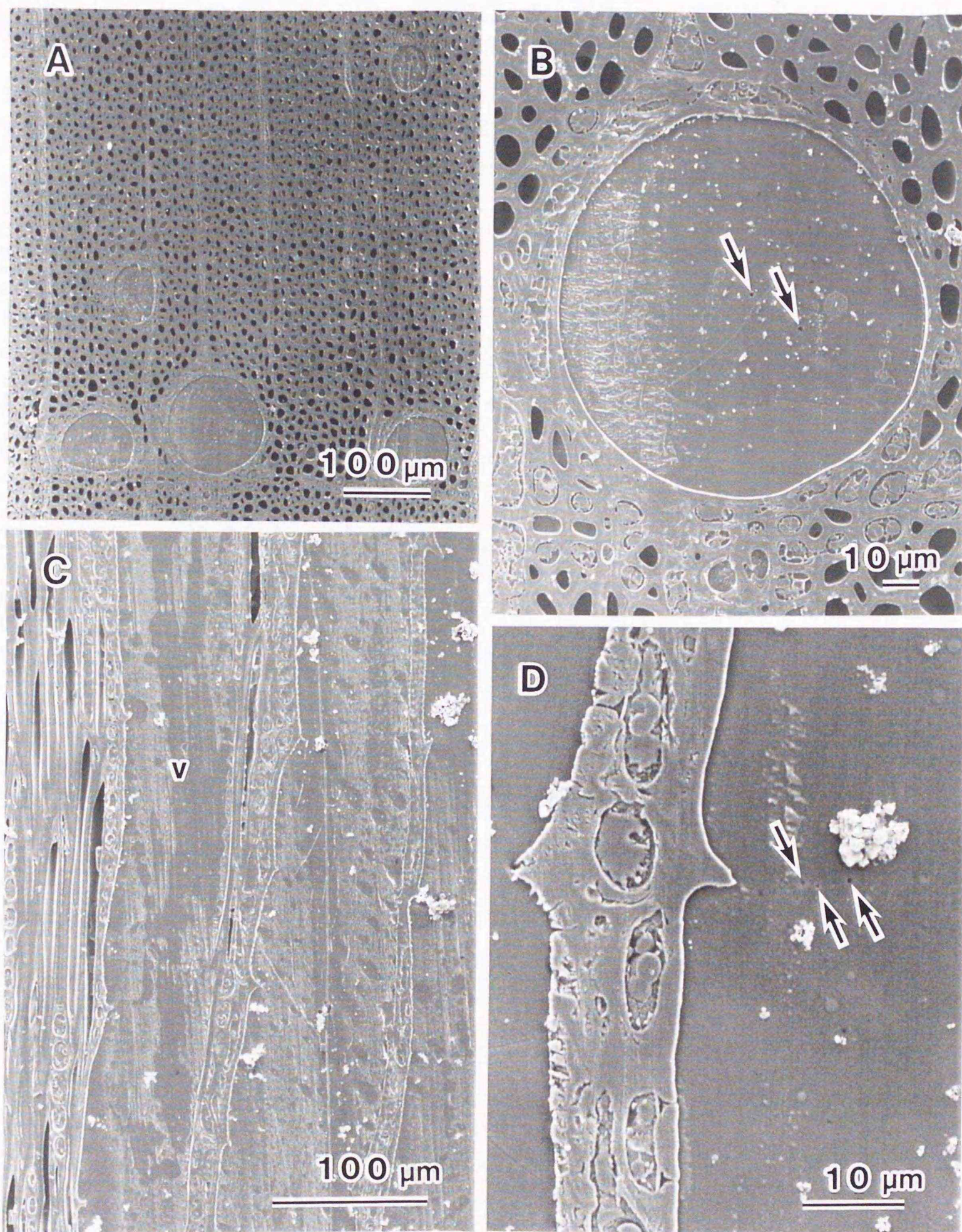


Fig. 5.2 コントロール試料の当年孔圏部の Cryo-SEM 写真. A, 木口面. B, 木口面. 矢印は気泡を示す. C, 板目面. v は道管を示す. D, 板目面. 孔圏部. 矢印は気泡を示す.

は水で満たされていた (Fig. 5.3A) . また, 孔圏道管の内こうの水の表面に気泡が観察された (Fig. 5.3B, 矢印) . 当年の孔圏部の板目面からの観察でも, 孔圏道管の内こうが水で満たされており (Fig. 5.3C) , 内こうの水の表面には気泡が存在した (Fig. 5.3D) . 凍結試料の気泡はコントロールで見られた気泡よりも径の大きなものが観察された. 250 倍から 2660 倍に拡大された SEM 写真上で観察を行ったところ, 気泡の直径は $0.2\sim 14\mu\text{m}$ であり, 直径 $1\mu\text{m}$ 以上の大きな気泡が多数観察された. Fig. 5.3D には直径 $1\mu\text{m}$ 以下の小さな気泡 (小矢印) と直径約 $10\mu\text{m}$ の大きな気泡 (大矢印) が見える.

これに対して融解処理を施した試料では, 当年の孔圏道管に当年の孔圏外道管には観察されなかった大きな変化が起きた. 融解時間が長くなるにつれて当年の孔圏道管の内こうから徐々に水が消失していった.

融解処理 1 時間後, 当年の多くの孔圏道管の内こうは水で満たされていたが, 当年のいくつかの孔圏道管の内こうには水が認められなかった (Fig. 5.4A, 矢印) . 空隙が存在していた当年の孔圏道管の割合は約 30% であった (Fig. 5.5) .

融解処理 2 時間後, いくつかの道管の内こうは水で満たされていたが, そのほかの道管の内こうには空隙が存在した (Fig. 5.4B, 矢印) . 板目面での当年孔圏部の観察においては内こうが水で満たされている道管 (Fig. 5.4C, 大矢印) , 空隙 (Fig. 5.4C, アステリスク) が存在している道管, 内こうにほとんど水が存在しない道管 (Fig. 5.4C, 小矢印) がそれぞれ観察された. 観察された空隙 (Fig. 5.4D, アステリスク) の接線径は約 $80\mu\text{m}$ であった. 空隙が存在していた当年の孔圏道管の割合は約 50% であった (Fig. 5.5) .

融解処理 4 時間後, 内こうに水がほとんど存在しない道管と内こうが水で満たされている道管がそれぞれ観察された (Fig. 5.4E) . また, 板目面での当年孔圏部の観察においては道管の内こうに大きな空隙 (Fig. 5.4F, アステリスク)

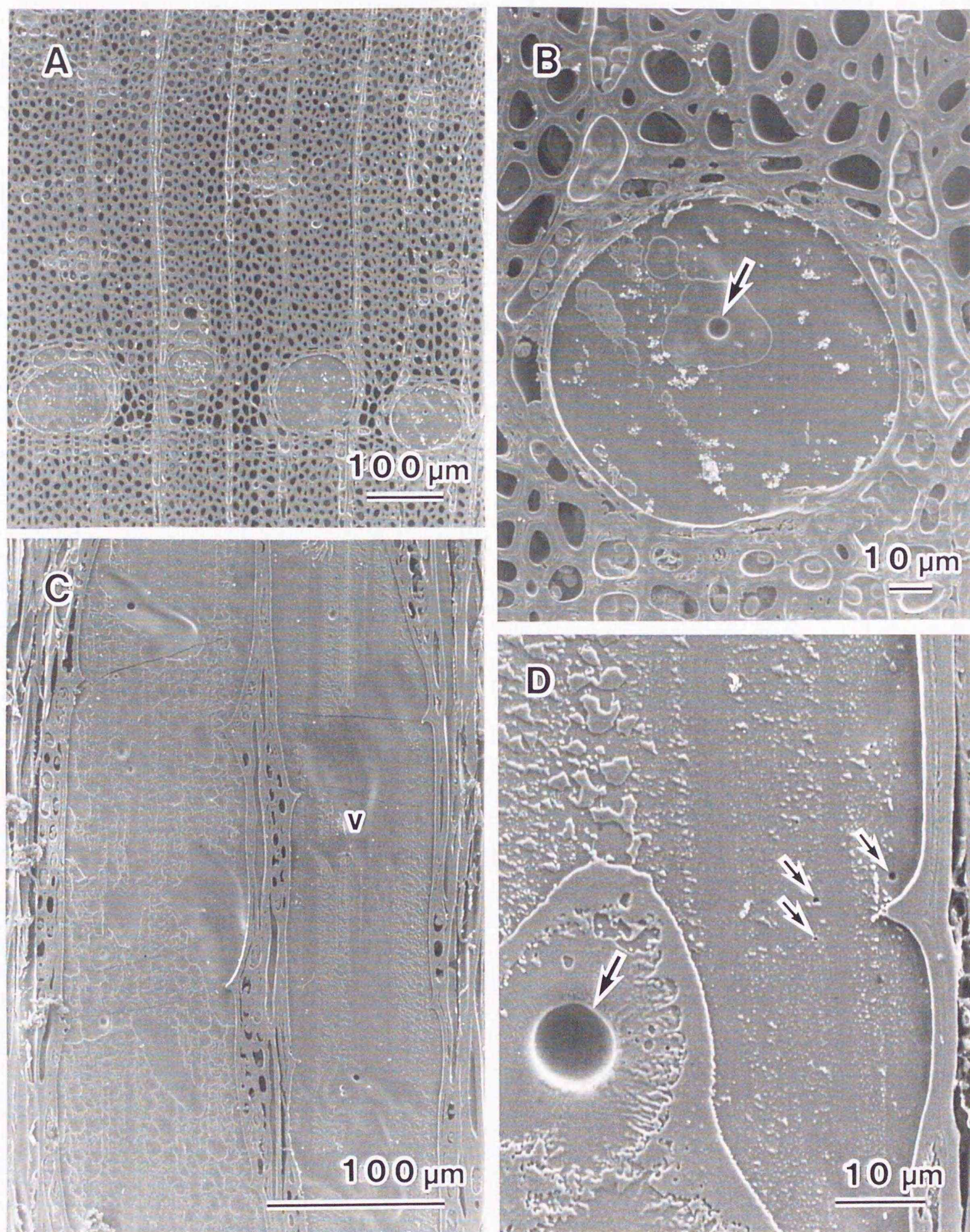


Fig. 5.3 凍結試料の当年孔圏部の Cryo-SEM 写真. A, 木口面. B, 木口面. 矢印は気泡を示す. C, 板目面. v は道管を示す. D, 板目面. 孔圏道管内こうの一部. 小矢印は小さな気泡, 大矢印は大きな気泡を示す.

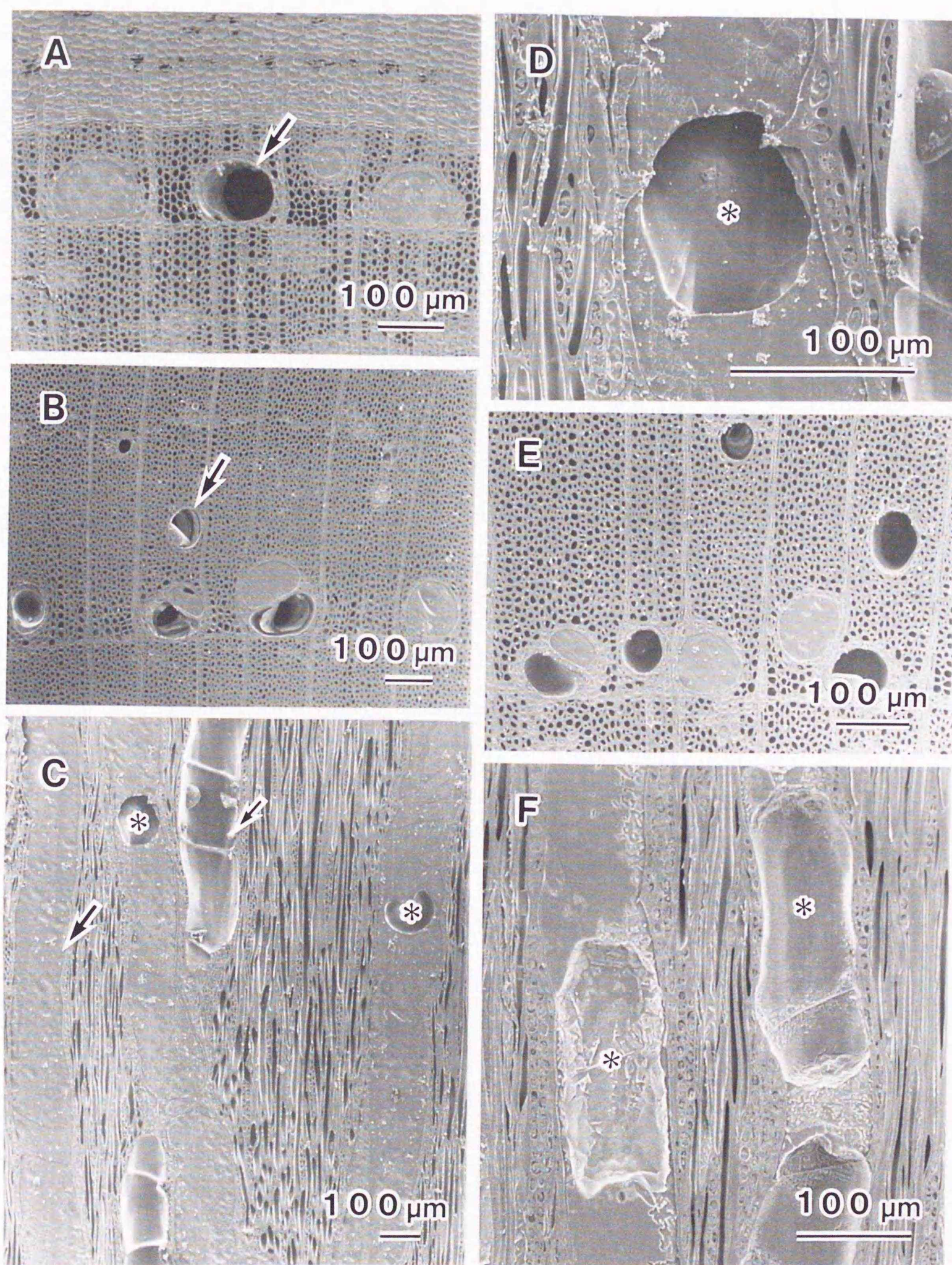


Fig. 5.4 融解試料の当年木部の Cryo-SEM 写真. アステリスクは空隙を示す. A, 融解 1 時間後. 木口面. 矢印は水が見られない道管を示す. B, 融解 2 時間後. 木口面. 矢印は空隙が見られる道管を示す. C, 融解 2 時間後. 板目面. 孔圏部. 大矢印は水で満たされている道管, 小矢印はほとんど水が見られない道管を示す. D, 融解 2 時間後. 板目面. 孔圏部. E, 融解 4 時間後. 木口面. F, 融解 4 時間後. 板目面. 孔圏部.

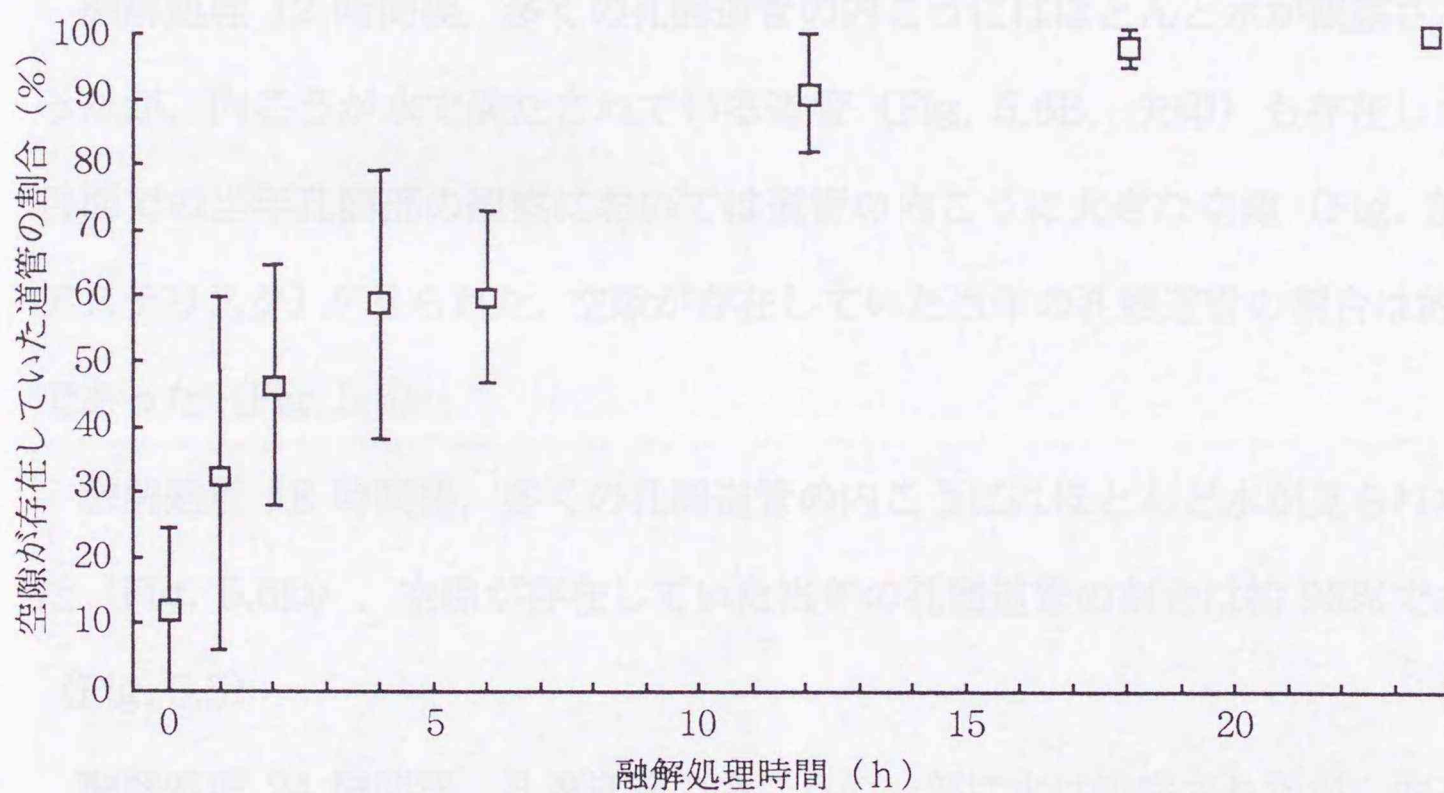


Fig. 5.5 ヤチダモの当年孔圏道管における凍結・融解処理後の空隙が存在していた道管の割合の変化.

が存在している様子が認められた。空隙が存在していた当年の孔圏道管の割合は約 60%であった (Fig. 5.5)。

融解処理 6 時間後、内こうに水がほとんど存在しない道管と内こうに水が存在する道管がそれぞれ観察された (Fig. 5.6A)。また、内こうに水と空隙が存在する道管も見られた (Fig. 5.6A, 矢印)。空隙が存在していた当年の孔圏道管の割合は約 60%であった (Fig. 5.5)。

融解処理 12 時間後、多くの孔圏道管の内こうにはほとんど水が観察されなかったが、内こうが水で満たされている道管 (Fig. 5.6B, 矢印) も存在した。板目面での当年孔圏部の観察においては道管の内こうに大きな空隙 (Fig. 5.6C, アステリスク) が見られた。空隙が存在していた当年の孔圏道管の割合は約 90%であった (Fig. 5.5)。

融解処理 18 時間後、多くの孔圏道管の内こうにはほとんど水が見られなかった (Fig. 5.6D)。空隙が存在していた当年の孔圏道管の割合は約 95%であった (Fig. 5.5)。

融解処理 24 時間後、孔圏道管の内こうの一部に水は観察されたが、内こうが水で満たされている道管は観察されなかった (Fig. 5.6E)。板目面での当年孔圏部の観察においては道管の内こうの一部に水が存在しているだけであった (Fig. 5.6F, 矢印)。

コントロール・凍結・融解処理試料の大部分の観察試料では、当年の多くの木部繊維の内こうには水が見られなかったが、一部の木部繊維の内こうには水が見られた。しかし、少数の観察試料では多くの木部繊維の内こうが水で満たされている場合もあった (Fig. 5.6D)。

凍結・融解処理によるヤチダモの当年の孔圏部におけるキャビテーションの進行過程の模式図を Fig. 5.7 に示す。

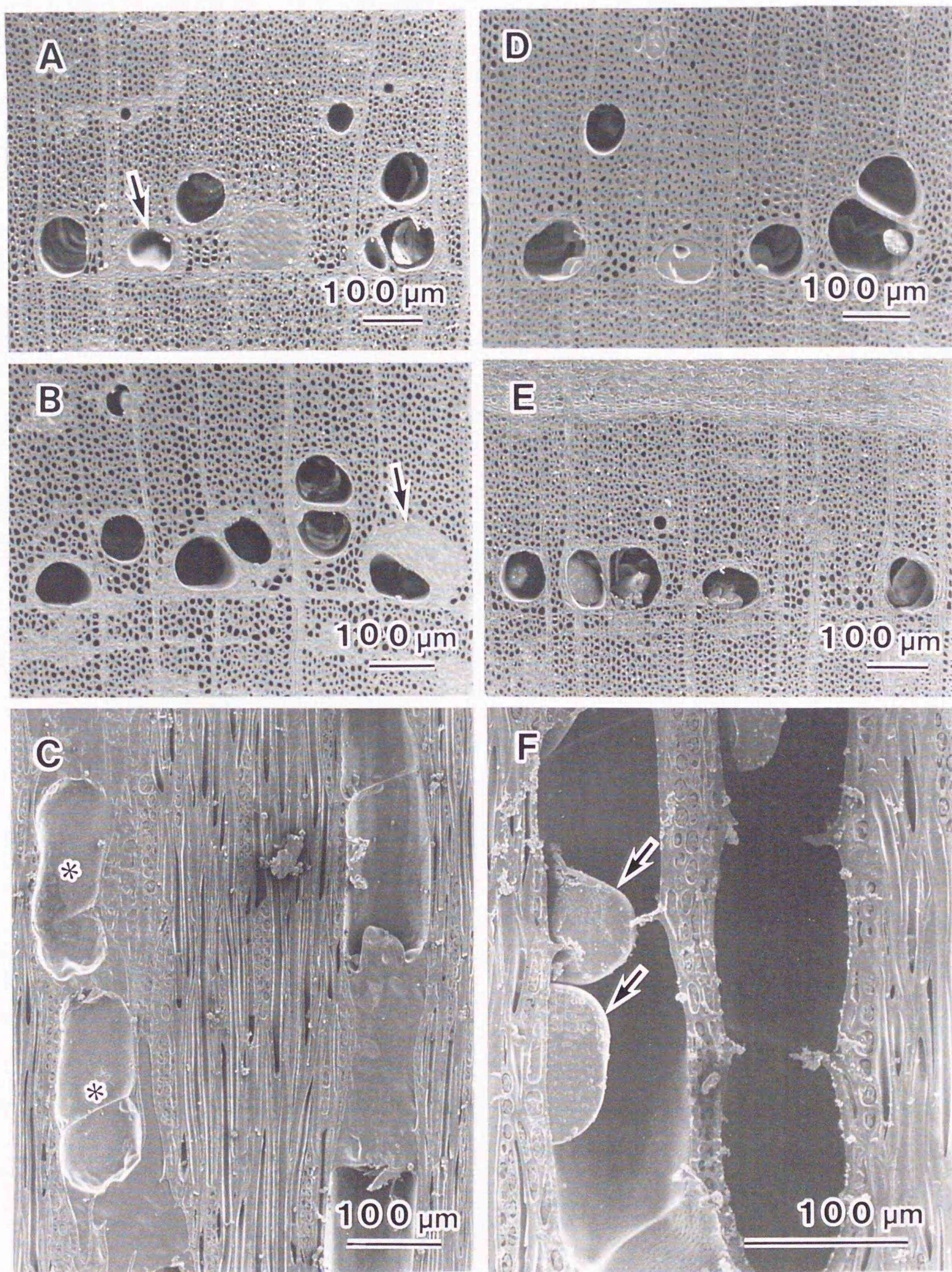


Fig. 5.6 融解試料の当年木部の Cryo-SEM 写真. A, 融解 6 時間後. 木口面. 矢印は空隙が見られる道管を示す. B, 融解 12 時間後. 木口面. 矢印は水で満たされている道管を示す. C, 融解 12 時間後. 板目面. 孔圏部. アステリスクは空隙を示す. D, 融解 18 時間後. 木口面. E, 融解 24 時間後. 木口面. F, 融解 24 時間後. 板目面. 孔圏部. 矢印は道管内この水を示す.

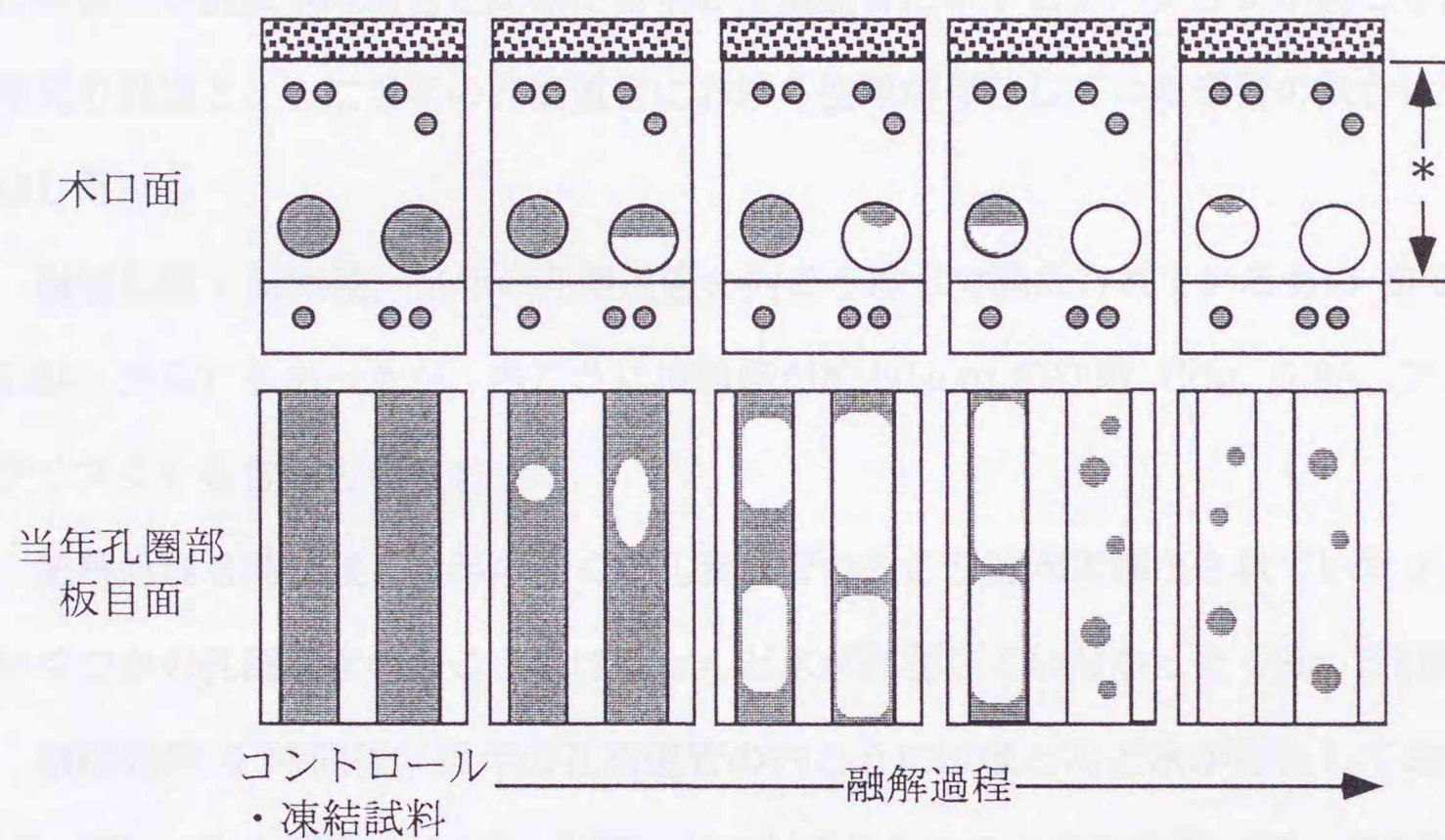


Fig. 5.7 ヤチダモの当年孔圈部における凍結・融解過程での水分分布の変化.

- ■, 内こうが水で満たされていた道管.
- ■, 内こうに空隙が存在した道管.
- □, 内こうにほとんど水が存在しなかった道管.
- , 師部. *, 当年木部.

5.3.2 凍結試料の融解過程での当年孔圏部の水分分布の変化

ヤチダモを低温室内（ -20°C ）で凍結させた後に切断して採取した幹試料を用いて、融解処理を施し、木部水分分布の変化を Cryo-SEM により観察した。

低温室で採取した 15cm 長の幹試料においても、融解処理を施すと、ポットに植栽した供試木の場合と同様に当年の孔圏道管にキャビテーションが起こり、時間の経過とともに当年の孔圏道管における空隙が存在していた道管の割合は増加した。

融解処理 1 時間後、当年の孔圏道管の内こうは水で満たされているもの（Fig. 5.8A, 矢印）もあったが、内こうに接線径が約 $60\mu\text{m}$ の空隙（Fig. 5.8A, アステリスク）を含むものもあった。

融解処理 2 時間後、当年の多くの孔圏道管の内こうは水で満たされていたが、いくつかの孔圏道管の内こうにはほとんど水が存在していなかった（Fig. 5.8B）。

融解処理 4 時間後、当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水が存在しておらず一部にのみ水（Fig. 5.8C, 矢印）が存在するものや大きな空隙（Fig. 5.8C, アステリスク）が存在するものが観察された。

融解処理 6 時間後、内こうにはほとんど水が存在しない孔圏道管と水で満たされている孔圏道管が観察された（Fig. 5.8D）。

融解処理 12 時間後、多くの当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水が見られなかった（Fig. 5.8E）。融解処理 18 時間後の試料においても当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水が見られなかった。融解処理 24 時間後の当年の孔圏道管の内こうにはほとんど水が見られなかった（Fig. 5.8F）。

5.3.3 凍結ストレスを回避させた試料の当年孔圏部の水分分布

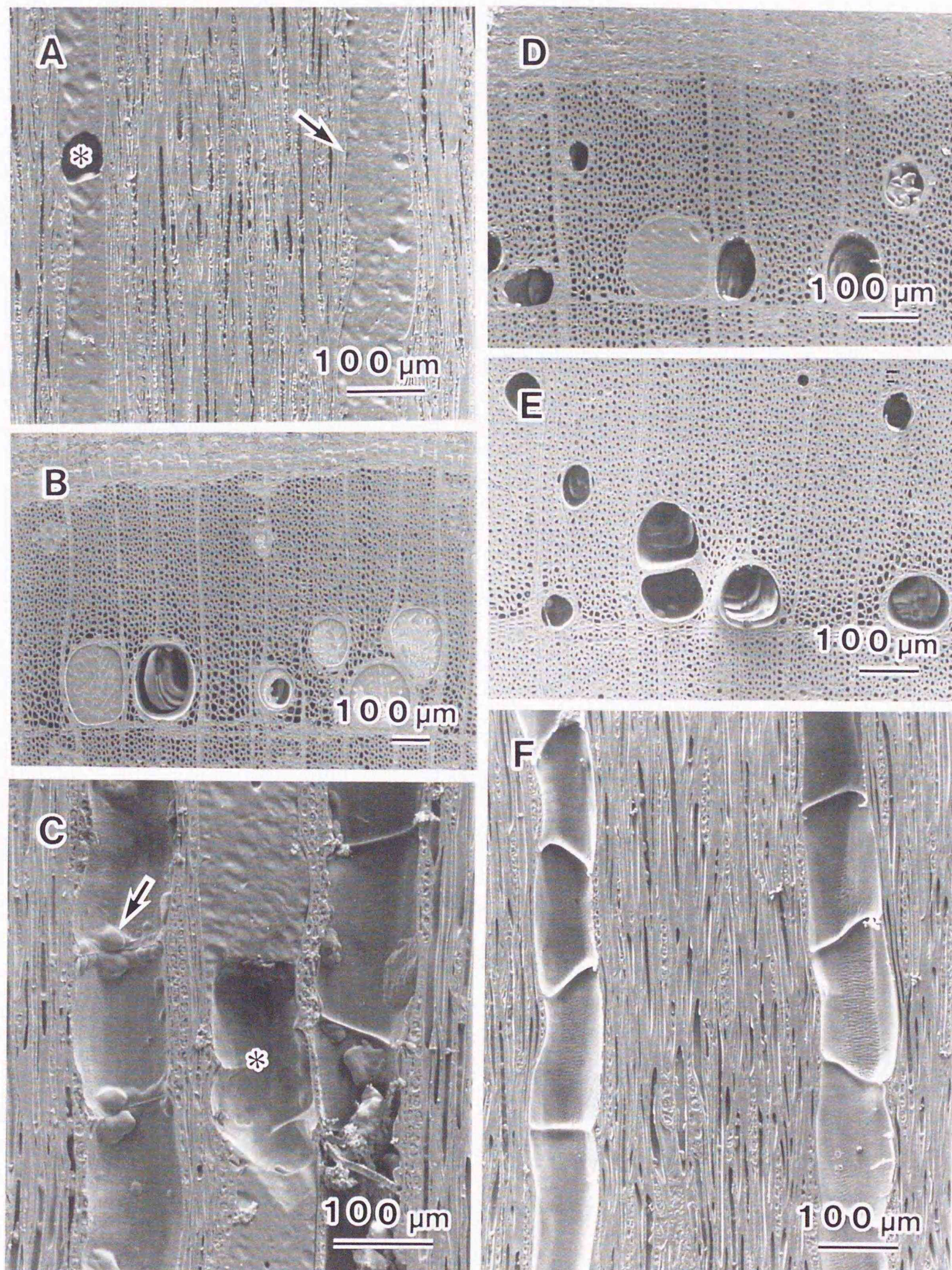


Fig. 5.8 凍結幹試料の融解試料の当年木部の Cryo-SEM 写真. アステリスクは空隙を示す. A, 融解 1 時間. 板目面. 孔圏部. 矢印は水で満たされた道管を示す. B, 融解 2 時間後. 木口面. C, 融解 4 時間後. 板目面. 孔圏部. 矢印は道管内この水を示す. D, 融解 6 時間後. 木口面. E, 融解 12 時間後. 木口面. 孔圏部. F, 融解 24 時間後. 板目面. 孔圏部.

冬期間温室にて生育させることにより凍結ストレスを回避させた供試木および苗畑に植栽したコントロールの供試木の木部水分分布を Cryo-SEM により観察した。

苗畑に植栽されていたコントロールの供試木より 12 月に採取した試料では、当年の孔圏道管の内こうには水がほとんど存在しておらず、内こうの一部に水が観察されるだけであった (Fig. 5.9A)。これに対して、温室で生育させた供試木より 12 月に採取した試料では、当年の多くの孔圏道管の内こうが水で満たされていた (Fig. 5.9B)。なお、この試料においては、当年の孔圏部の木部繊維の内こうが水で満たされていたが、もう一本の温室で生育していた供試木は観察時すでに枯死しており、孔圏外道管を含めて木部全体の道管および木部繊維の内こうに水がほとんど存在していなかったため、この時期の試料が、すべてこのような傾向を示すのかは明らかにできなかった。

3 月に採取した試料においても、苗畑に植栽されていたコントロールの供試木より採取した試料では前年の孔圏道管の内こうには水がほとんど存在していないのに対して (Fig. 5.9C)、温室で生育させた供試木より採取した試料では前年の孔圏道管の内こうは水で満たされていた (Fig. 5.9D)。したがって、温室に生育させた供試木では孔圏道管からの水の消失は起こらないといえる。

5.3.4 凍結・融解処理試料の CLSM による検討

凍結・融解処理を施した際の当年の孔圏道管の内こうの水の移動の方向や範囲を検討するため、蛍光染料を 3, 4 年生の供試木に吸引させて凍結・融解処理を施し、孔圏道管の内こうからの染料の移動を CLSM で観察した。蛍光染料としては 0.1% FITC 水溶液もしくは 0.1% ロードミン B 水溶液を用いたが、ロードミン B による染色法がより明確な蛍光像を示した。凍結融解処理試料・コント

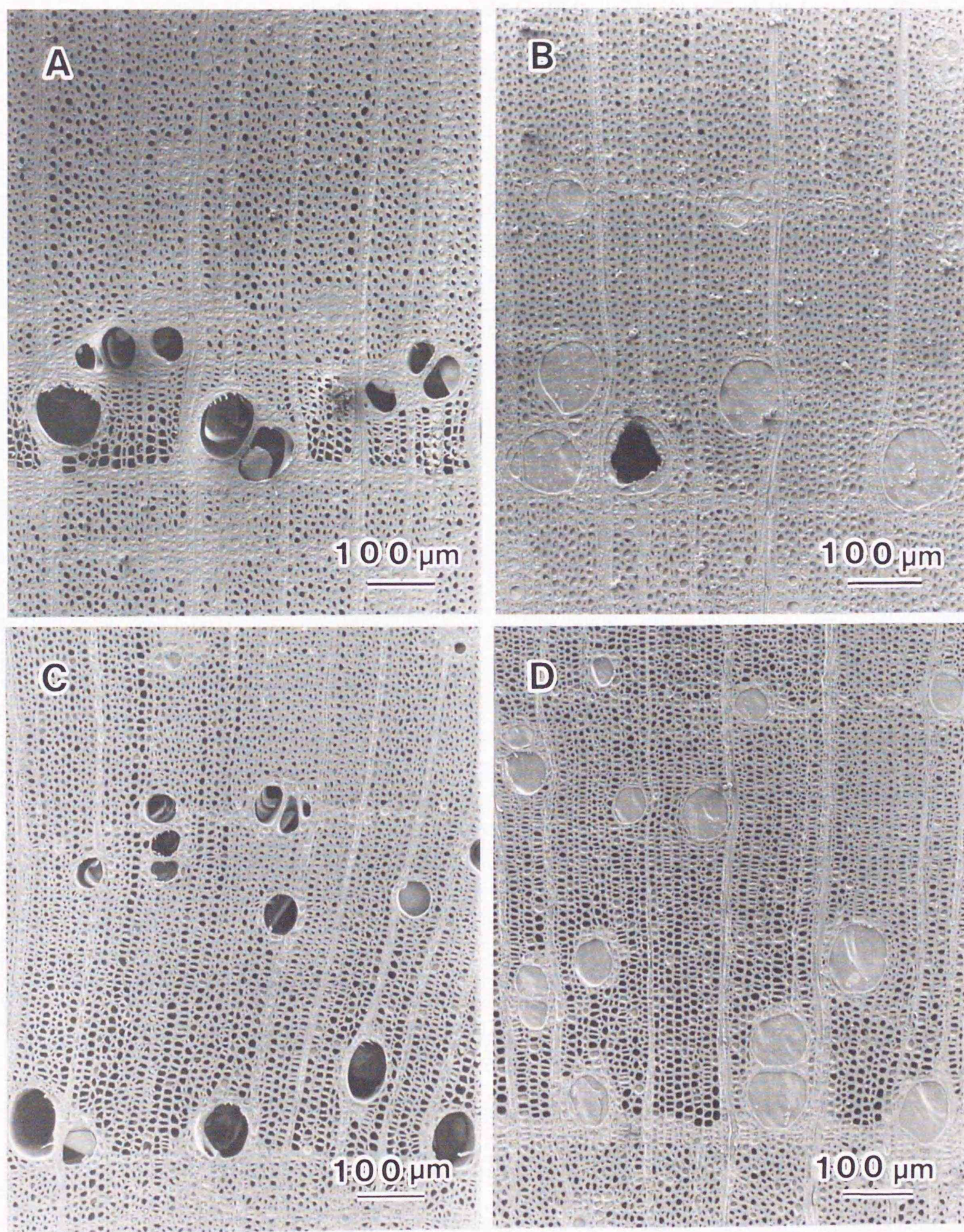


Fig. 5.9 苗畑および温室で生育したヤチダモの Cryo-SEM 写真. 木口面. A, 苗畑の 12 月の当年孔圏部. B, 温室の 12 月の当年孔圏部. C, 苗畑の 3 月の前年孔圏部. D, 温室の 3 月の前年孔圏部.

ロールいずれの試料でも当年の多くの孔圏道管には蛍光が見られたが、蛍光が見られない道管も存在した。また、試料によっては木部に強い蛍光が見られないものもあった。観察期間を通じて、多くの凍結・融解処理試料ではコントロールの試料と比較して、当年の孔圏道管周囲の木部繊維や柔細胞に強い蛍光が観察された。以下に、多くの道管にローダミン B の染色が見られた 7 月の結果を記す。写真はすべて光学的切片の重ね合わせ像を示す。

7 月の試料において、凍結・融解処理を施した試料を観察したところ、融解処理後 2 時間後の試料において当年の多くの孔圏道管の周囲の軸方向柔細胞や、道管に隣接した放射組織とともに、孔圏道管周囲の木部繊維にも蛍光が観察された (Fig. 5.10A)。当年の孔圏道管周囲の木部繊維に見られた蛍光領域は、融解時間が長くなると孔圏部のより広い範囲で観察された (Fig. 5.10, B, C)。融解処理後 24 時間の試料では、当年の孔圏部の多くの木部繊維に蛍光が観察されるようになった (Fig. 5.10D)。これに対してコントロールの多くの当年の孔圏部では、孔圏道管周囲の軸方向柔細胞、孔圏道管に隣接する放射組織およびそれらの柔細胞に隣接する木部繊維の一部に蛍光が観察されたものの (Fig. 5.11A, B)、孔圏部の多くの木部繊維の内こうに蛍光は見られなかった。しかし、Fig. 5.11C に見られたような、孔圏道管周囲の木部繊維の蛍光が観察される試料もあった。コントロールの試料におけるこのような孔圏道管周囲の木部繊維の蛍光はいくつかの試料で観察された。しかし孔圏部の大部分では、室温で放置後 24 時間を経過しても、当年孔圏道管周囲の軸方向柔細胞と放射組織にのみ蛍光が観察されるだけであった (Fig. 5.11D)。

5.4 考察

本章では 4 年生ヤチダモの木部を人工的に確実に凍結させた後に再び融解さ

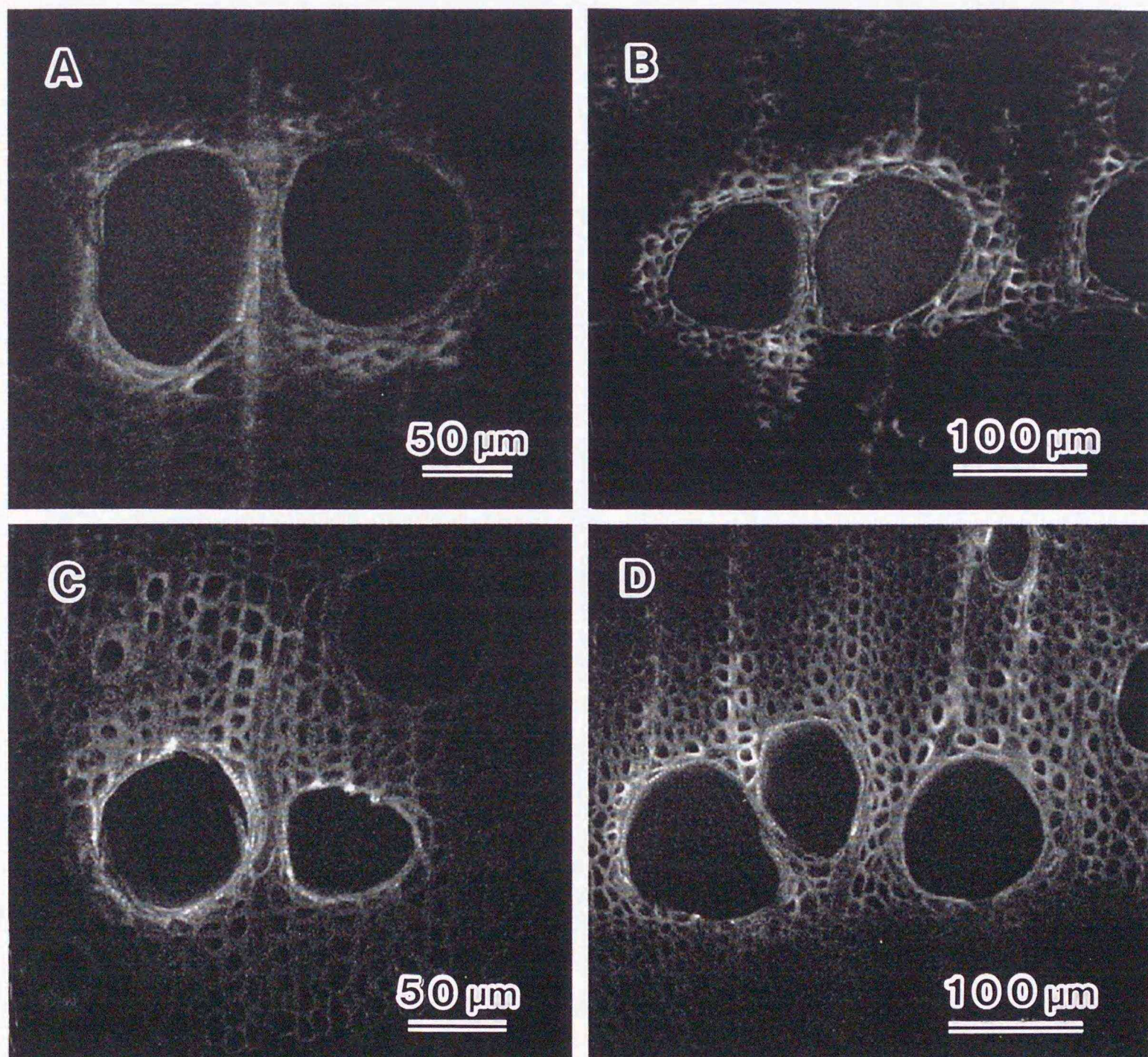


Fig. 5.10 凍結・融解処理試料の当年孔圏部の CLSM 写真. 木口面. 蛍光物質はローダミン B. A, 処理 2 時間後. B, 処理 6 時間後. C, 処理 12 時間後. D, 処理 24 時間後.

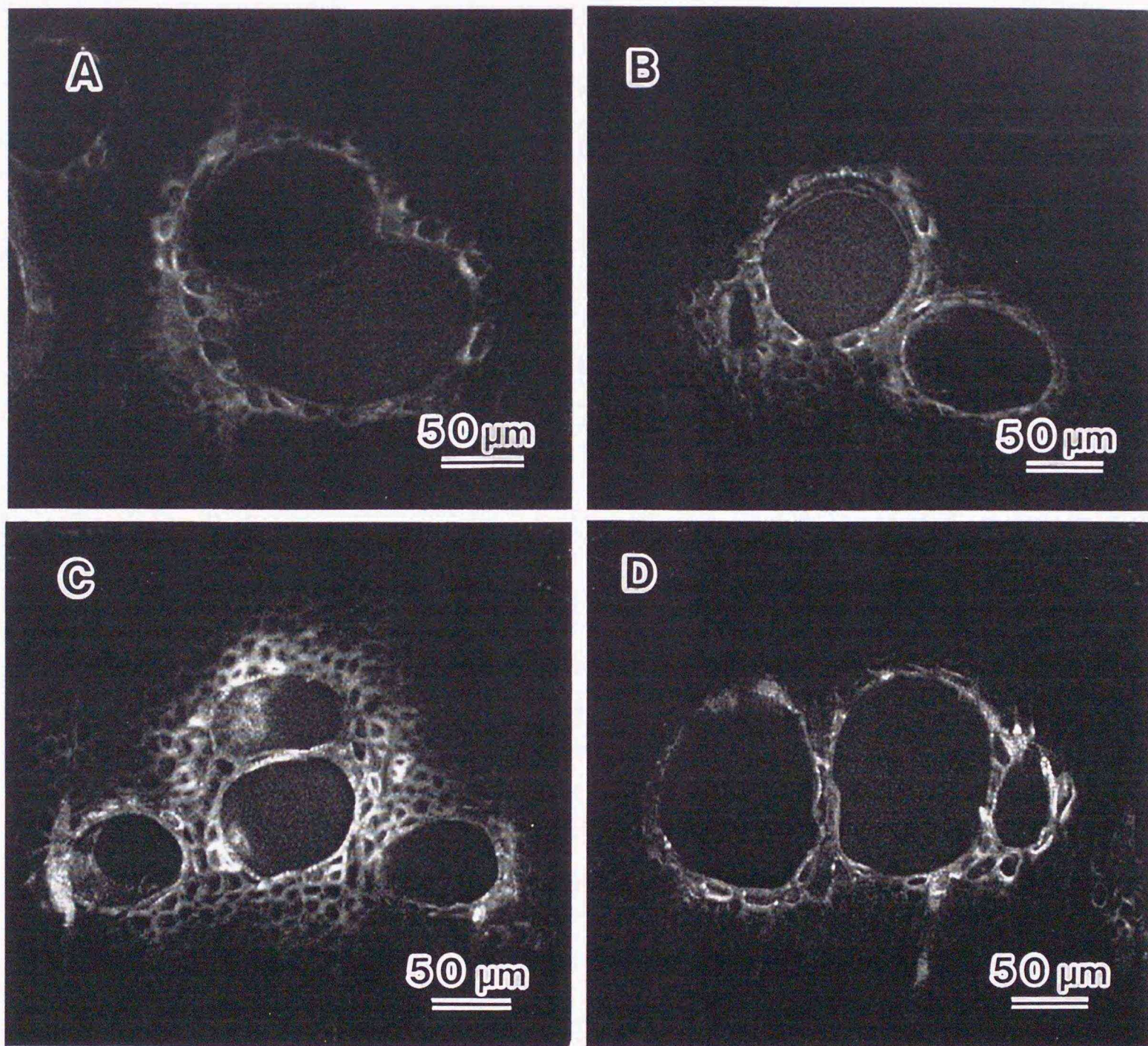


Fig. 5.11 コントロール試料の当年孔圏部の CLSM 写真. 木口面. 蛍光物質はローダミン B. A, 処理 2 時間後. B, 処理 6 時間後. C, 処理 12 時間後. D, 処理 24 時間後.

せ、その過程で道管にキャビテーションが起きるかどうかを検討し、キャビテーションが起きた場合には、道管の内こうに空隙が形成される過程と道管の内こう全体に空隙が形成されるのに要する時間、キャビテーションが起きる道管の径と年輪内での部位について検討した。

Cryo-SEM による観察からは凍結処理を施した試料ではコントロールの試料と同様に当年の孔圏道管の内こうは水で満たされており (Fig. 5.2, 5.3) , 融解処理試料では時間の経過とともに内こうに空隙が存在する道管の割合が増加した (Fig. 5.4, 5.5, 5.6) . これまでに考えられている木部の凍結によるキャビテーションの進行過程の仮説 (Tyree and Sperry, 1989 ; Sperry, 1993) によると、通水系内の水に溶解していた気体は、水が氷になり気体の溶解度が低下することにより気泡として出現する (Lybeck, 1959 ; Sucoff, 1969) . 続いて通水系内の氷が融解する時から融解した後に通水系に張力が働くとこれらの気泡が拡大してキャビテーションが起きると考えられている (Tyree and Sperry, 1989 ; Sperry, 1993) . 本研究ではヤチダモの当年の孔圏道管において凍結時にはキャビテーションは進行せず、続いて起こる木部の融解時にキャビテーションが進行することを実験的に明らかにした。

凍結試料において当年の孔圏道管の内こうの水に気泡が Cryo-SEM により観察された。これまでも凍結した木部内の氷に気泡が存在することが報告されており、その気泡の大きさは約 $1\mu\text{m}$ であるという報告もある (Sucoff, 1969) . 本研究では、凍結試料で観察された気泡の直径は $0.2\sim 14\mu\text{m}$ であり、 $1\mu\text{m}$ 以上の大きな気泡も多数観察された。コントロールの試料においてもいくつかの気泡が観察されたが、多くの気泡は直径が $1\mu\text{m}$ 以下であり、凍結試料で見られたそれより大きな気泡 (Fig. 5.3D) はこれまでに考えられているキャビテーションの進行時の核になる可能性がある。

当年の孔圏道管におけるキャビテーションは融解過程で進行し、24 時間以内には大きな空隙がすべての道管の内こうに存在した (Fig. 5.6) . 本研究で利用したヤチダモのような冬期間に気温が氷点下を記録する地域に生育する環孔材樹木の木部では、秋期から冬期にかけて最初に気温が零度を下回った後に透水度が著しく低下することが報告されている (Cochard and Tyree, 1990 ; Cochard et al., 1992 ; Sperry and Sullivan, 1992 ; Sperry et al., 1994 ; Hacke and Sauter, 1996a) . これらの報告は木部の凍結により環孔材樹木の通水系に水分通導機能障害が一斉に起きたことを示唆している. しかし、透水度が著しく低下した時点での道管の内こうの水の量と存在領域は未解明であった. さらに道管の内こうから水がほぼ完全に消失するのにどの程度の時間を要するかについては明らかではなかった. 本研究の結果から木部の凍結後の融解時に時間の経過とともに当年孔圏部の道管の内こうに空隙が拡大して、短時間のうちにすべてのそれらの道管の内こうから水がほとんど消失することが明らかになった.

本研究の結果、当年の孔圏道管の場合とは対照的に、当年および前年の多くの孔圏外道管では、凍結・融解処理を施しても観察期間中道管の内こうに水を保持し続けていた. 少なくともヤチダモの場合は孔圏外道管においては木部の凍結によるキャビテーションが孔圏道管よりも起こりにくいと考えられる. 凍結によるキャビテーションと道管の径の関係についてはこれまでも報告されており (Sperry and Sullivan, 1992 ; Tyree et al., 1994 ; Tyree and Cochard, 1996) , Sperry and Sullivan (1992) によると、大きな径の通水要素では小さな径の通水要素よりも小さな張力で凍結によるキャビテーションが起きる. したがって、環孔材樹木において孔圏道管にキャビテーションが発生した場合は小径の孔圏外道管が水分通導に重要な役割を果たすようになると考えられる. 第 3 章でも述べたように、環孔材樹木であるヤチダモにおいては、前年に形成された孔圏外道

管の多くは内こうに水を保持している。新たに形成された孔圏道管が未成熟で水分通導機能を保持していない時期には、これらの前年の孔圏外道管が水分通導の役割を担っている可能性が高い。

低温室で採取した 15cm 長の幹試料のキャビテーションの進行過程はポットに植栽した試料のそれと同様であった。15cm 長の幹試料を使った実験では、両切断面を防水しているのにもかかわらずポットに植栽した試料と同様に融解処理時にキャビテーションが徐々に進行し、融解処理 24 時間以内にすべての当年の孔圏道管の内こうにほとんど水が見られなくなった (Fig. 5.8)。以上の結果から、当年の孔圏道管にキャビテーションが進行する際に道管の内こうの水が樹軸方向へは大きく移動しないことが明らかになった。

第 3 章で述べたように、自然条件下の 15 年生ヤチダモの 11 月の試料では、10 月まで水で満たされていた当年の孔圏道管の内こうに水がほとんど見られなくなるのに対して、10 月の時点では内こうに水が認められなかった当年の孔圏道管の周囲の多くの木部繊維の内こうが水で満たされる現象が観察された (Fig. 3.3, 3.4)。当年の孔圏道管にキャビテーションが起きた際、道管の内こうから周囲の木部繊維の内こうに水が移動したと考えられる。しかしながら、自然条件下での 3, 4 年生ヤチダモの観察や、凍結・融解処理を行った 4 年生ヤチダモの観察では、成長期間中の試料およびコントロールとして採取した試料においても当年の木部繊維の内こうに水が観察されたものもあった。また、融解過程の試料においても当年孔圏部の木部繊維の内こうが水で満たされているものも観察された。しかしながら、いずれの試料においても多くの木部繊維の内こうに水が認められないものも観察されたため、孔圏道管の内こうから木部繊維の内こうに水が移動したことを明らかにできなかった。

そこで、3, 4 年生ヤチダモにおいて当年の孔圏道管に蛍光染料を吸引させた

後に、凍結・融解処理を施したものと凍結ストレスを与えないものとの時間経過による蛍光染料の分布の変化を CLSM 法で観察したところ、凍結・融解処理を施した多くの試料では、コントロールの試料と比較して当年の孔圏道管周囲の柔細胞ばかりでなく、孔圏部の木部繊維にも蛍光が観察された (Fig. 5.10, 5.11) . この結果は、凍結・融解処理により当年の孔圏道管の内こうから周囲の木部繊維に染料が移動したことを示している。しかし、試料によってはコントロールにおいても孔圏道管周囲の組織に蛍光が強く観察されるものも見られた (Fig. 5.11C) . ヤチダモと同じトネリコ属のアオダモ (*Fraxinus lanuginosa* Sieb. et Zucc.) の木部繊維長は 1200~1400 μm であると報告されている (古川ら, 1983) . 本研究で使用した切片は約 0.5mm 厚であり、切片作製時にほとんどの木部繊維が切断されている可能性がある。切断された木部繊維の内こうに染料が拡散し、木部繊維に蛍光が強く観察されることが考えられる。切片中の木部繊維の切断を防ぐためには試料を木部繊維長よりも厚くする必要があると考える。

当年の孔圏道管の内こうの水が周囲の木部繊維へ移動する場合は、道管から木部繊維に直接移動する経路と髄伴柔組織や放射組織を経由して木部繊維へ移動する経路が考えられる。ヤチダモの孔圏道管は髄伴散在柔組織、周囲柔組織、放射組織に接しているが、木部繊維とも一部接している (Fig. 2.4A, 3.2B, 3.3B) . Barnett et al. (1993) はセリスナラ (*Quercus cerris* L.) にサフラニンを吸引させてその分布を観察し、道管から放射柔細胞への染料の移動が起こり、これは柔細胞のプロテクティブレイヤーの多孔性に起因すると考察している。CLSM 観察時にも道管周囲の木部繊維とともに軸方向柔細胞や放射柔細胞の細胞壁にも強い蛍光が見られた (Fig. 5.10) . 凍結によりキャビテーションが進行する時に柔細胞を経由して木部繊維への水の移動が起きる可能性があると考える。一方、道管から木部繊維への水の直接の移動は道管・木部繊維間壁孔を通して行われる

と考えられる。しかし、ヤチダモでは道管と木部繊維が隣接している領域には道管・木部繊維間壁孔はほとんど存在しない (Sano et al., 1994) 。したがって、道管から木部繊維へ水が直接移動する可能性は少ないと考えられる。

温室に冬期間生育させたヤチダモの当年の多くの孔圏道管の内こうは、翌年の3月になっても水で満たされていた (Fig. 5.9) 。第3章で述べたように自然条件下で生育するヤチダモでは、15年生と3, 4年生いずれのの供試木でも当年の孔圏道管の内こうから秋期から冬期にかけての一時期に水が消失した (Fig. 3.4, 3.8, 3.9) ことと、温室で生育させた実験の結果は大きく異なった。第3章では3, 4年生のヤチダモの当年の孔圏道管にキャビテーションが起きた原因を特定することはできなかったが、本実験の結果は自然条件下においてもヤチダモのキャビテーションは木部の凍結により引き起こされたことを示している。

本章ではヤチダモの木部に人工的に凍結・融解処理を施した場合と、凍結を人工的に回避させて生育させた場合の当年孔圏部の木部水分分布の変化をCryo-SEMを用いて検討した。また、融解過程での道管の内こうからの水の移動を検討するため、当年の孔圏道管に蛍光染料を吸引させた後に凍結・融解処理を行いCLSM法により観察した。これらの結果、凍結・融解過程で当年の孔圏道管の内こうから水が消失していくことがCryo-SEMにより観察された。これに対して凍結を回避して越冬させた供試木では、最外年輪の多くの孔圏道管の内こうに水が存在した。したがって、木部の凍結によりヤチダモの当年の孔圏道管にキャビテーションが起こると結論した。また、キャビテーションの進行は融解過程で起こり、融解後1日以内に当年のすべての孔圏道管の内こうに空隙が存在した。この現象は樹軸方向の水の動きを制限させた試料においても見られた。また、CLSM法により当年の孔圏道管の内こうに蛍光染料を吸引させて凍結融

6.1 Cryo-SEM による木部の水分分布の観察法の検討

本論文では Cryo-SEM をおもな実験手法として用いた。これまでも Cryo-SEM を用いて生立木における木部の水分の観察が行われてきている (Ohtani and Fujikawa, 1990 ; 佐野ら, 1993 ; Sano et al., 1995 ; 佐野と藤川, 1995 ; 佐野, 1996)。しかし、従来の手法では立木の木部の水分分布を細胞レベルで広い範囲にわたって観察することが困難な場合がある。そこで、本論文ではこれまでに得られている知見にもとづき Cryo-SEM を用いて木部の水分の分布を視覚化する場合の試料の採取法、観察試料の作製法、観察法について検討した。

供試木が蒸散を行っている時には通水系の水には負圧が作用している。この時、通水系が大気下で切断されると、切断部から通水系に外気が侵入することが指摘されている (Crafts, 1939 ; Zimmermann and Brown, 1971)。樹木の水分通導の季節変化と水分通導機能の障害を組織学的に検討するためには、蒸散を行っている時期の試料においても観察を行う必要があるが、試料採取時に立木の水分分布が変化してしまう可能性がある。そこで本論文では、供試木の伐採後に小分割した試料を液体窒素を用いて凍結固定を行う液体窒素凍結法による試料と、伐採前に立木の試料採取部位を液体窒素で凍結固定する立木液体窒素凍結法による試料とを観察し、比較・検討した (第 2 章)。その結果、開葉時に試料採取を行った際に、液体窒素凍結法による試料では当年の孔圏道管の内こうにほとんど水が観察されなかったのに対して、立木液体窒素凍結法による試料では当年の多くの孔圏道管の内こうは水で満たされていた (Fig. 2.4 D, E, 2.5)。このことは立木液体窒素凍結法が木部の水分分布を立木のそれに

より近い状態で観察するのに有効な試料採取法であることを示している。

立木液体窒素凍結法により採取した試料を用いて開葉時のヤチダモ、シラカンバ、オノエヤナギの道管の内こうを観察し、ヤチダモの当年の多くの孔圏道管やシラカンバとオノエヤナギの樹皮側から数えて 1, 2 年輪目の多くの道管の内こうが水で満たされていることを明らかにした (第 3, 4 章)。この結果は水分通導のメカニズムとして一般に受け入れられている凝集力説 (Dixon and Joly, 1894 ; Dixon, 1914) の前提とされている樹木の通水系に存在している水が凝集力により連続した水柱になっているという仮説を支持する。しかし、開葉時の試料では内こうに空隙が存在している道管も観察された (Fig. 4.6A, C)。草本植物の根や葉の道管では成長期間中の日中にキャビテーションが起きた道管の割合が上昇し、その後低下するという報告もある (Canny, 1997a, b ; McCully et al., 1998)。樹木においても成長期間中の通水系でキャビテーションが起きている可能性があり、その原因としては水ストレスが考えられる。木部圧ポテンシャルの値は日の出前後が最も高くなると報告されており (佐藤と森川, 1976 ; 森川と佐藤, 1976 ; 高橋, 1976 ; 佐藤, 1977), 本論文においては開葉時の試料を採取する際には、木部圧ポテンシャルが比較的低下していないと考えられる午前中に試料の採取を行った。開葉時も含めて立木の木部水分分布の季節変化を観察する際には、蒸散による水ストレスが緩和されている状態で立木液体窒素凍結法により試料採取を行うのが最も適当であると結論される。

さらに、立木液体窒素凍結法では試料採取部位における凍結速度が問題になることがある。比較的急速に木部が凍結すると考えられる 4 年生のヤチダモの試料においても、当年の孔圏道管の内こうに小さな気泡が観察された (Fig. 5.2B, D)。-20℃の低温室で凍結させた試料の気泡 (Fig. 5.3D) と比較すると小径の

ものが多く見られたが、厳密な観察を行うためには試料をより急速に凍結する必要がある。また、道管内こうに存在する比較的大径の空隙では、水と気体との境界面が湾曲した形状ではなく不自然な形をしている場合があり (Fig. 5.6C, 5.8C), 凍結が緩速で進行したために気泡の変形が起きた可能性が考えられた。直径の大きな樹木の木部水分分布の観察を行う場合には、本研究で用いた立木液体窒素法では樹幹の髄近辺において凍結が比較的緩速に進むことが考えられる。本論文で観察したシラカンバの樹幹では辺材内層部でも多くの道管の内こうが水で満たされている様子が観察された (Fig. 4.10D, 4.11D, 4.12D) が、さらに直径の大きな供試木の樹幹の髄近辺の木部水分分布を観察する際には、樹皮や観察に用いない部位の木部を剥離して髄近辺の木部までの凍結速度を高める必要がある。

Cryo-SEM 用の観察試料の作製法としては、凍結切断法 (Fujikawa et al., 1988 ; 藤川ら, 1989 ; 黒田, 1998) と凍結切削法 (佐野ら, 1993 ; Sano et al., 1995 ; 佐野と藤川, 1995 ; 佐野, 1996) が用いられている。これまでに凍結切断法により作製された試料により放射線細胞の凍結挙動 (Fujikawa et al., 1994, 1996 ; 藤川ら, 1995 ; Kuroda et al., 1997 ; 黒田ら 1997) や道管の内こうの水の存否 (Ohtani and Fujikawa, 1990) が明らかになっている。しかし、凍結切断法により作製された試料では、とくに木口面において切断にもなって生じた組織片や氷晶の破片が切断面の大部分を覆ってしまい、観察できる領域が限られてしまうことが報告されている (佐野と藤川, 1995)。これに対して凍結切削法により作製した試料では、凍結切断法と比較して木口面においても木部の構成細胞の輪郭やそれらの内こうの水の状態を試料内の広い範囲にわたって正確に観察できると報告されている (佐野と藤川, 1995)。本論文では、立木の木部の水分分布をできるだけ広い範囲でとらえたいという観点か

ら凍結切削法による観察を行った。その結果、凍結切削法による木口面、柾目面および板目面のいずれの観察においても道管および木部繊維の内こうに存在する水の状態を試料内の広い範囲にわたって正確に観察できた。したがって、凍結切削法による作製試料を用いた Cryo-SEM 観察が木部の構成細胞の内こうに存在する水を細胞単位で把握するのに有効であると考えられる。

しかし、立木液体窒素凍結法による採取試料から凍結切削法により作製した試料の Cryo-SEM 観察においても、立木の木部水分分布をありのままの状態で見えることは困難であった。立木時には道管が水で満たされていると考えられる場合にも、エッチングされた氷の切削面に窪みが発生していることがあった。これは試料表面を切削する際に刃先の高さよりも低いレベルで部分的に大きな氷晶が剥離してしまうためだと考えられる (Fig. 2.7)。このような大きな氷晶の剥離は、試料の縦断面を切削した場合にヤチダモの当年の孔圏道管にしばしば観察された (Fig. 2.5D, 3.3C, 5.3C, 5.8A, C)。これは、縦断面での孔圏道管の内こうの氷の面積が、孔圏外道管、シラカンバやオノエヤナギの道管および木部繊維のそれと比べて大きく、切削時に試料内での切削部位により木部組織の切削抵抗が異なるため、ミクロトームの刃を動かす速度が変化して大きな圧力が氷晶に加わり、大きな氷晶の剥離が起きることが考えられる。内こうが水で満たされている大径の道管を含む試料の縦断面を切削する場合には、さらに低速で切削を行う必要があると考える。

道管の内こうに大きな空隙が存在している場合には、切削時に生じた氷晶片や切削屑が道管の内こうに落ちこんでいるように見えるものも観察された (Fig. 3.9D, 5.8C)。また、試料の表面に霜と考えられる小粒子が多く付着しているものも見られた (Fig. 2.4B)。予備実験ではブローアーやフロンガススプレーを用いて観察表面の付着物の除去を試みたが、良好な結果は得られなかった。こ

これらの氷晶，切削屑，霜を最小限に抑制するためには，常に新しいマイクロームの刃先を用いて観察面の切削を行い，切削後速やかにクライオシステム内に移動させることが必要である。

立木液体窒素凍結法により採取し，凍結切削法により作製した試料の観察から，道管の内こうの水と軸方向柔細胞や放射柔細胞の内こうの原形質を判別することができた (Fig. 2.4A, 3.2D, 3.3D, 5.2D)。放射柔細胞や軸方向柔細胞の内こうの原形質にはエッチング処理後も切削面とほぼ同じ高さの部分と切削面より窪んでいる部分があるのに対して，道管と木部繊維の内こうに存在する水の観察面は比較的平滑であり，エッチング処理により切削面より一様に窪んでいることでそれらの区別が可能であった。しかし，試料によっては道管の内こうの水の観察面と柔細胞内こうの原形質の観察面がともに平滑であり区別が困難なものも見られた (Fig. 3.5B)。柔細胞内こうの原形質と道管の内こうの水が区別できない場合があった原因としては，エッチング処理が不十分なために切削面と水の観察面がほぼ同一になったことが考えられる。

Cryo-SEM によりヤチダモ，シラカンバ，オノエヤナギの当年の木部繊維の内こうには成長期間中に水分が観察された (Fig. 3.1, 3.2, 3.7C, D, 4.6)。木部繊維の内こうの水分が道管の内こうの水と異なっている様子が観察される試料もあった (Fig. 3.2A)。しかし本論文においては，Cryo-SEM による観察だけでは当年の木部繊維の内こうの水分が水か原形質かを特定することができなかった。そこで，本論文ではメチレンブルー・アズール A-塩基性フクシンで二重染色した薄切片を光学顕微鏡で観察することにより，成長期間中のヤチダモの当年の木部繊維の内こうに原形質が存在することを示し (Fig. 3.14)，木部繊維の成熟とともに原形質が消失していくことを明らかにした。しかし，光学顕微鏡による観察では，当年のすべての木部繊維の内こうの水分が原形質で

あるかどうかは明らかにできなかった。Cryo-SEM 観察では当年の木部繊維が成熟し原形質を失った後にも道管や柔細胞に隣接した木部繊維の内こうに水が存在しているものも見られた (Fig. 3.2B, 3.8D)。当年の木部繊維の内こうに存在した水と原形質を厳密に区別するためには、より高倍率で Cryo-SEM 観察を行い、それらの微細な表面構造の違いの明らかにする必要がある。

立木液体窒素法を用いて採取した試料を凍結切削法により作製して Cryo-SEM で観察することにより、試料の広い範囲にわたって木部の水分分布を細胞単位で視覚化することができた。この手法により試料作製時に変形を起こしやすい形成層帯の薄壁の細胞の輪郭や内こうの原形質を明瞭に観察することもできた (Fig. 3.1D, 3.2D)。しかし、この手法を用いて木部の水分分布を観察するためには大規模な低温実験施設や SEM クライオシステム (Fujikawa et al., 1988 ; 藤川ら, 1989) が必要であり、試料を作製する際の作業も容易ではない。加えて観察試料表面の付着物の影響を避けるためには、1 回の観察にしか作製試料を使用できなかった。本論文で検討した Cryo-SEM 法は木部の水分分布を効果的かつ正確に観察するのに適した方法ではあるが、試料の採取時の凍結速度、試料作製時の付着物の除去、複数回の観察に適する試料の作製・保存方法についてさらに検討を加える必要がある。

6.2 ヤチダモおよびシラカンバ、オノエヤナギの水分通導

開葉前の 4 月でのシラカンバとオノエヤナギの樹皮側より数えて 1, 2 年輪目では、ほとんどの道管の内こうが水で満たされていた (Fig. 4.4, 4.5)。開葉前の時期にカバノキ属やカエデ属で木部の透水度が上昇することはこれまでも報告されており、木部で測定される正の圧力が透水度の上昇に関与していると考えられている (Sperry et al., 1988c ; Sperry, 1993 ; Hacke and Sauter,

1996a). 木部で測定される正圧のうち、根の能動的吸水に由来すると考えられる根圧により、道管の内こうに存在していた気体は通水要素内こうの水中に溶解するか、道管外に押し出されてしまい、その結果、水分通導機能が回復する場合があると考えられている (Sperry et al., 1987). しかし、木部の正圧がマノメーターにより検出されない樹木においても冬期と比較して透水度が上昇したという報告もある (Sperry., 1993).

根に正圧が生じる原因としては、根が土壌から積極的に溶質を吸収し、根の木部中に蓄積することがおもなものとされている。溶質が根に蓄積すると、根の水ポテンシャルが低下して能動的吸水が起き、この時、蒸散が少ない場合には正圧が生じるとされている (Kramer, 1983 ; 平沢, 1998). しかし、どの植物においても程度の差はあるものの、溶質は根に存在する。特定の樹種のみで測定される木部の正圧を根圧と解釈することには問題がある。

樹木の木部の正圧はおもにマノメーターによりこれまで測定されており (Merwin and Lyon, 1909 ; Scholander et al., 1955 ; Sperry et al., 1987 ; Ewers et al., 1997), 樹幹にせん孔した後、せん孔部で測定される圧力を根に起因する圧力として解釈されてきた。しかし、ハルニレ (*Ulmus davidiana* var. *japonica* (Rehd.) Nakai) では、辺材で正圧が測定されないときにも心材で正圧が測定されることが報告されており (石田と大谷, 1966), 樹幹のせん孔部の深さによって測定される圧力が異なる可能性がある。樹幹のせん孔部の圧力を測定する方法では通水系の圧力を正確に測定しているとはいえない。近年、採取した根を用いて根に生じる圧力を直接測定する試みが行われている (Steudle, 1994 ; Hallgren et al., 1994). その結果、環孔材樹木で 50~150kPa, 針葉樹で 1~4kPa の圧力が測定されたと報告されている。程度の差はあるものの樹木の根は能動的吸水を行っていると考えられる。しかし、針葉樹で測定

された圧力値では、樹冠までのすべての通水系を再び水で満たすのに十分ではない。

道管の内こうが再び水で満たされる原因としては、このような根圧ではなく、柔細胞が関与しているとする報告もある (Braun, 1984)。この報告によると、温帯に生育する樹木は、春期の開葉前に通水系に隣接する柔細胞から通水系に有機物と無機物を分泌し、この通水系内の溶質により通水系の浸透圧が低下して吸水が起こるとしている。

また、カエデ属の樹木では根ではなく樹幹に生じる圧力により道管の内こうが水で満たされることが報告されている (O'Malley and Milburn, 1983; Milburn and O'Malley, 1984)。これによると、凍結時に道管の内こうの水の一部は体積膨張により隣接する木部繊維の内こうに侵入する。これに伴い、道管から水が侵入した木部繊維の内こうの気体は圧縮され、その気体は高い圧力をもつ。ついで融解時にこの正の圧力により木部繊維の内こうの水は再び道管の内こうに押し出されるとしている。

一方、針葉樹では水ストレスを与えて含水率が低下したヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris* L.) にアジ化ナトリウム水溶液を与えて柔細胞が死んだ場合でも含水率が上昇したことから、仮道管の内こうが水で満たされることに柔細胞は関与しないとする報告があり (Borghetti et al., 1991)、毛管現象が仮道管の内こうが水で満たされる一因になると考えられている (Grace, 1993)。

このように道管の内こうが再び水で満たされる原因にはいくつかの可能性が考えられる。カバノキ属では立木の木部での比較的大きな正圧がこれまでに測定されており、これが根に由来するものだとすると、根圧によりシラカンバの道管の内こうが再び水で満たされたとも考えられる。しかし、オノエヤナギでは本研究でシラカンバに溢泌現象が見られた 4 月の試料採取時にも溢泌現象は

認められなかった。また、同じヤナギ科のアメリカヤマナラシではマノメーターにより正圧が検出されていない (Sperry et al., 1994)。オノエヤナギの道管が水で満たされる原因としては、根圧だけではなくこれまでに述べたさまざまなことが関係していると考えられる。

成長期間中、ヤチダモでは当年の孔圏道管と辺材の孔圏外道管の内こうに、またオノエヤナギとシラカンバでは少なくとも樹皮側から数えて 1, 2 年輪目の道管の内こうに水が存在することが、Cryo-SEM による観察の結果から明らかになった (Fig. 3.1, 3.2, 3.7, 4.6, 4.12)。加えて立木染色法での染料注入部より高い部位においては、ヤチダモでは当年の孔圏道管とそれらの周囲の組織がおもに染色され、シラカンバでは辺材の道管とそれらの周囲の組織が染色されていた (Fig. 3.10, 3.11, 4.13)。これらの結果から、ヤチダモではおもに当年の孔圏道管で水分通導を行い、シラカンバとオノエヤナギでは少なくとも樹皮側から数えて 1, 2 年輪目の道管が水分通導を行うことが明らかになった (第 3, 4 章)。

しかし、ヤチダモにおいては冬芽が開き始めた 5 月の時点では当年の形成中の道管が見られたものの (Fig. 3.1)、立木染色の結果、注入孔上 0.5m より上部での木部の染色は見られなかった。4 年生のヤチダモの当年の孔圏道管の形成開始について調べた報告によると、頂芽と側芽の開葉が見られた時期において、当年の孔圏道管に地上高の高い部位では完成したせん孔が観察されたのに対して地上高の低い部分では見られなかったとしている (岩立ら, 1998)。また、同じ環孔材樹木であるハリギリ (*Kalopanax pictus* (Thunberg) Nakai) においては開葉後、ただちに当年孔圏道管のせん孔の形成が完成したと報告されている (今川と石田, 1972)。5 月の前年の多くの孔圏外道管の内こうは水で満たされており (Fig. 3.1A)、開葉直後の当年の孔圏道管が完全に成熟して

いない時期には前年以前の木部の孔圏外道管が水分通導を行っていると考えられる。一方、散孔材樹木であるブナ (*Fagus crenata* Blume) では、当年の道管に完成したせん孔が見られたのは 7 月初旬であり、6 月中旬にはせん孔はまだ完成していなかったと報告されている (Ohtani and Ishida, 1976)。6 月の時点ではすでに開葉していると考えられることから、ブナにおいてはこの時期では前年以前の木部の道管が水分通導を行っていたと考えられる。数種の散孔材樹木では最初の道管の成熟が開葉から 4 週間から 8 週間後に見られたという報告もあり (Suzuki et al., 1996)、シラカンバとオノエヤナギにおいては、開葉直後の時期では前年以前の木部の道管が水分通導を行っていると考える。

木部の透水性を定期的に測定したこれまでの報告から、冬期間に気温が氷点下を記録する地域に生育する環孔材樹木では、最初に氷点下の気温が記録された後に透水性が著しく低下すると報告されている (Chocard and Tyree, 1990; Cochard et al., 1992; Sperry and Sullivan, 1992; Sperry et al., 1994; Hacke and Sauter, 1996a)。また、冬期間に気温が氷点下を記録する地域に生育する散孔材樹木でも冬期間に透水性の低下が認められている (Sperry et al., 1988c; Magnani and Borghetti, 1995) が、一般に冬期間の透水性の低下は環孔材樹木と比較して散孔材樹木では小さい (Sperry, 1993; Hacke and Sauter, 1996a)。このように道管に起きるキャビテーションや透水性の低下が環孔材樹木と散孔材樹木で異なる原因としては通水要素の径の違いがその一つに考えられている (Tyree et al., 1994)。径の異なるガラス管内の水を凍結・融解させた実験では、小径のガラス管内の気泡はすぐ融解したのに対して大径のガラス管内では気泡の融解に時間を要したと報告されている (Ewers, 1985)。樹木での通水要素の径と凍結による透水性の低下を比較した実験からも、小径の通水要素をもつ樹種では凍結による透水性の低下が起こりにくいという報告

もある (Langan et al., 1997).

本論文では、ヤチダモの当年の孔圏道管において秋期から冬期にかけての一時期にキャビテーションが一齐に起きることを Cryo-SEM を用いて明らかにした (Fig. 3.3, 3.4, 3.8, 3.9). これに対して、ヤチダモの孔圏道管にくらべて小径のシラカンバとオノエヤナギの道管では、冬期間での時間経過とともに内こうに空隙が存在する道管の年輪内での割合が次第に増加していくことが観察された (Fig. 4.1, 4.2, 4.7, 4.8). ヤチダモの孔圏道管のように大径の道管の内こうでは、凍結時に形成された気泡が融解時にただちに水に溶解しなかったためにキャビテーションが起きるが、シラカンバとオノエヤナギの道管の内こうでは融解時に気泡が比較的短時間に水中に溶解してしまうためにキャビテーションが起きにくいと考えられる. また、道管と木部繊維の内こうの水がもつ毛管圧力の差がキャビテーションの起こりやすさに関係する可能性もある. 毛管内に液体表面がある時、液体表面はメニスカスを形成し、表面張力によって毛管力を発生する. この時の毛管圧力 (P) は次式より求められる (佐道, 1985).

$$P = 2\sigma \cos \theta / r$$

(σ : 液体の表面張力, θ : 接触角, r : 毛管の半径)

毛管圧力は毛管の半径に反比例するので、ヤチダモの大径の孔圏道管と木部繊維との圧力差は、シラカンバとオノエヤナギのヤチダモより小径の道管と木部繊維とのそれと比較して大きい. この大きな圧力差のために、ヤチダモの孔圏道管がシラカンバとオノエヤナギの道管と比較してキャビテーションが起こりやすいことが考えられる.

オノエヤナギでは 3 月の時点においても年輪ターミナル部付近の大部分の小径道管の内こうは水で満たされていた (Fig. 4.2A). また、ヤチダモの孔圏外道管は、孔圏道管の内こうの水が消失した後も内こうに水を保持していた (Fig.

3.5B, 3.7A). このような通水要素の径と木部の凍結によるキャビテーションの関係はヤチダモとオノエヤナギでは認められる。しかし、シラカンバにおいては、大径の道管ばかりではなく小径の道管の内こうにも水が見られない場合があり (Fig. 4.1A), 道管径と空隙が存在している道管との間に明瞭な関係が見られなかった。オノエヤナギでは道管は単せん孔をもち、孤立管孔が多いのに対して、シラカンバでは道管は階段せん孔板をもち、放射複合管孔や集団管孔が多く、道管の横断面形も変化にとんでいる。シラカンバの道管をオノエヤナギの道管のように単純な管と考えると凍結によるキャビテーションとの関係を考えることには問題がある。凍結によるキャビテーションの樹種による違いを検討する際には、上述の道管の径だけではなく周囲仮道管の存在、管孔の配列、管孔の複合、道管の横断面形、道管せん孔、道管壁孔のみならず道管壁の微細構造についての樹種的特徴を考える必要がある。

シラカンバとオノエヤナギの道管内こうは開葉前の4月に水で再び満たされた (Fig. 4.4, 4.5, 4.11) のに対して、ヤチダモの孔圏道管の内こうは当年の秋期から冬期にかけて水を消失した後、再び水で満たされることはなかった (Fig. 3.4, 3.5A, 3.8C, D, 3.9C, D)。道管の内こうが毛管現象により再び水で満たされると仮定すれば、シラカンバとオノエヤナギの道管と比較してヤチダモの径の大きい孔圏道管の毛管圧力がシラカンバやオノエヤナギの道管のそれと比較して小さいために、ヤチダモの当年の孔圏道管では水の再充填が起こらないといえる。しかし、大径の道管をもつつる性木本植物の数樹種においても開葉前に透水性が上昇することが報告されている (Sperry et al., 1987; Ewers et al., 1997)。これらのつる性木本植物では根圧により透水性が回復したと考えられている。このように道管の径と水の再充填の起こりやすさには必ずしも明確な関係はない。道管内こうの水の再充填にはさまざまな樹種的特徴が関係してい

ると考える。

ヤチダモの当年の孔圏道管が翌年になっても再び水で満たされない原因としてはチロースやゴム様物質の発生が考えられる。ヤチダモにおいては樹皮側から数えて2年輪目の孔圏道管にチロースが形成されていたと報告されている(斉藤, 1993; Saitoh et al., 1993)。また, 北海道に生育する環孔材樹木のハリエンジュ (*Robinia pseudoacacia* L.) では10月に当年の孔圏道管にバッドチロースが現れ始め, 翌年の8, 9月にチロース形成の最盛期になると報告されている(石田ら, 1976)。本論文においても10月に採取した試料の当年の孔圏道管の壁表面に付着物が見られるものがあった (Fig. 3.4C)。高倍による観察を行わなかったため, この付着物がチロースかゴム様物質かを判別できなかったが, 水分が消失した孔圏道管の内こうにチロースやゴム様物質が形成されたために, 翌年になっても再び水で満たされないことは考えられる。興味深いことに本州に生育するハリエンジュでは, 当年のすべての孔圏道管の内こうは, その年の秋期にチロースにより閉塞されてしまうという報告がある (Fujita et al., 1978)。本州に生育するハリエンジュの孔圏道管は木部の凍結ではなくチロースの形成により水分通導機能障害を起こす可能性がある。本論文では冬期間に気温が氷点下になる地域に生育する環孔材樹木と散孔材樹木において木部の凍結によりキャビテーションが起きることを明らかにしたが, 木部が冬期間でも凍結しない地域に生育する環孔材樹木と散孔材樹木の水分通導と水分通導機能障害についてはいまだ明らかにされておらず, 今後の検討課題である。

道管を円管と考えると流量は圧力勾配に比例し管の半径の4乗に比例する。ヤチダモの孔圏道管がシラカンバとオノエヤナギの道管の2倍の径をもっているとすると, 水分通導に関してはヤチダモの孔圏道管1本がシラカンバやオノエヤナギの道管16本分に相当することになる。シラカンバやオノエヤナギで

水分通導が複数年輪の道管で行われるのは、当年の道管だけでは十分な水分通導が行えないためであると考えられる。一方、ヤチダモにおいては当年の孔圏道管で水分通導が効率よく行われるが、これまでに述べてきたように大径の道管では凍結によるキャビテーションが起きる危険性が増加する。ヤチダモ、シラカンバ、オノエヤナギはいずれも冬期間に気温が氷点下になる地域に生育しているが、木部の凍結によるキャビテーションに対してヤチダモでは新たな孔圏道管を形成することで対応し、シラカンバやオノエヤナギでは前年以前の道管を水で再充填することで対応するといった異なる方法で個体が枯死することを回避し、成長を続けると考える。

本論文では樹木の水分通導の季節変化と水分通導機能障害を組織学的に検討するため、Cryo-SEM による樹木の木部水分分布の観察法を確立した。この手法をおもに用いて、冬期間に気温が氷点下になる地域に生育する落葉広葉樹 3 樹種の水分通導の季節変化を検討し、水分通導機能障害が起きる過程を明らかにした。本論文で得られた成果は、樹木生理学、とくに樹木の水分通導に関する研究の進歩に寄与することが多いと考えられる。

謝辞

本研究の遂行と論文の作成にあたり終始ご指導を賜りました北海道大学農学部教授大谷諄博士，同助教授船田良博士，同助手佐野雄三博士に深甚なる感謝の意を表します。また，本論文の作成にあたり貴重なご意見を賜りました北海道大学農学部教授高橋邦秀博士に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり貴重な御意見と御助言をいただきました北海道大学低温科学研究所助教授藤川清三博士に深く感謝の意を表します。また，供試木の採取や苗木の植栽に便宜を図っていただきました北海道大学農学部教授寺澤實博士，北海道大学農学部附属演習林教授神沼公三郎博士，同助教授秋林幸男博士，同技官奥谷昭氏に感謝の意を表します。

また，本研究の円滑な遂行を支えていただきました北海道大学農学部森林科学科木材生物学講座事務補助員前川悦子さん，研究の遂行に際しさまざまな御助言と御協力をいただきました日本学術振興会特別研究員黒田克史博士，北海道大学大学院農学研究科渡辺陽子氏，村上豊氏，北海道大学農学部森林科学科木材生物学講座および北海道大学低温科学研究所低温基礎科学部門生物適応科学講座のみなさんに感謝の意を表します。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員制度によって行われており，文部省科学研究費補助金（特別研究員奨励費）の支給をもとに行われました。深く感謝します。

最後に，これまでの生活を支え励まし続けていただいた両親と家族に心から感謝します。

引用文献

1. Balling, A. and Zimmermann, U. (1990) Comparative measurements of the xylem pressure of *Nicotiana* plants by mean of the pressure bomb and pressure probe. *Planta* 182: 325-338.
2. Barnett, J. R., Cooper, P. and Bonner, L. J. (1993) The protective layer as an extension of the apoplast. *IAWA Journal* 14: 163-171.
3. Bentrup, F. W. (1996) NMR-microscopy: Observing xylem and phloem conduits at work. *Botanica Acta* 109: 177-179.
4. Borghetti, M., Edwards, W. R. N., Grace, J., Jarvis, P. G. and Raschi, A. (1991) The refilling of embolized xylem in *Pinus sylvestris* L.. *Plant Cell and Environment* 14: 357-369.
5. Borghetti, M., Cinnirella, S., Magnani, F. and Saracino, A. (1998) Impact of long-term drought on xylem embolism and growth in *Pinus halepensis* Mill. *Trees* 12: 187-195.
6. Braun, H. J. (1984) The significance of the accessory tissues of the hydrosystem for osmotic water shifting as the second principle of water ascent, with some thoughts concerning the evolution of trees. *IAWA Bulletin New Series* 5: 275-294.
7. Burggraaf, P. D. (1972) Some observations on the course of the vessels in the wood of *Fraxinus excelsior* L. *Acta Botanica Neerlandica* 21: 32-47.
8. Canny, M. J. (1997a) Vessel contents during transpiration - Embolisms and refilling. *American Journal of Botany* 84: 1223-1230.
9. Canny, M. J. (1997b) Vessel contents of leaves after excision - A test of Scholander's assumption. *American Journal of Botany* 84: 1217-1222.
10. Chaney, W. R. and Kozlowski, T. T. (1977) Patterns of water

movement in intact and excised stems of *Fraxinus americana* and *Acer saccharum* seedlings. *Annals of Botany* 41: 1093-1100.

11. Clark, J. and Gibbs, R. D. (1957) Studies in tree physiology. IV Further investigations of seasonal changes in moisture content of certain Canadian forest trees. *Canadian Journal of Botany* 35: 219-253.
12. Cochard, H., Bréda, N., Granier, A. and Aussenac, G. (1992) Vulnerability to air embolism of three European oak species (*Quercus petraea* (Matt) Liebl., *Q. pubescens* Willd., *Q. robur* L.). *Annales des Sciences Forestieres* 49: 225-233.
13. Cochard, H. and Tyree, M. T. (1990) Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. *Tree Physiology* 6: 393-407.
14. Cohen, Y., Fuchs, M., Falkenflug, V. and Moreshet, S. (1988) Calibrated heat pulse method for determining water uptake in cotton. *Agronomy Journal* 80: 398-402.
15. Crafts, A. S. (1939) Solute transport in plants. *Science* 90: 337-338.
16. Crombie, D. S., Milburn, J. A. and Hipkins, M. F. (1985) Maximum sustainable xylem sap tensions in *Rhododendron* and other species. *Planta* 163: 27-33.
17. Dixon, H. H. (1914) Transpiration and the ascent of sap in plants. Macmillan and Co., Ltd., London.
18. Dixon, H. H. and Joly, J. (1894) On the ascent of sap. *Annals of Botany* 8: 468-470.
19. Ellmore, G. S. and Ewers, F. W. (1986) Fluid flow in the outermost xylem increment of a ring-porous tree, *Ulmus americana*. *American Journal of Botany* 73: 1771-1774.
20. Ewers, F. W. (1985) Xylem structure and water conduction in

conifer trees, dicot trees, and lianas. IAWA Bulletin New Series 6: 309-317.

21. Ewers, F. W., Cochard, H. and Tyree, M. T. (1997) A survey of root pressures in vines of a tropical lowland forest. *Oecologia* 110: 191-196.
22. Fujikawa, S., Kuroda, K. and Fukazawa, K. (1994) Ultrastructural study of deep supercooling of xylem ray parenchyma cells from *Styrax obassia*. *Micron* 25: 241-252.
23. Fujikawa, S., Kuroda, K. and Ohtani, J. (1996) Seasonal changes in the low-temperature behavior of xylem ray parenchyma cells in red osier dogwood (*Cornus sericea* L.) with respect to extracellular freezing and supercooling. *Micron* 27: 181-191.
24. Fujikawa, S., Suzuki, T., Ishikawa, T., Sakurai, S. and Hasegawa, Y. (1988) Continuous observation of frozen biological materials with cryo-scanning electron microscope and freeze-replica by a new cryo-system. *Journal of Electron Microscopy* 37: 315-322.
25. 藤川清三・黒田克史・大谷 諄 (1995) 植物組織の Cryo-SEM 観察. 氷点下の温度への植物細胞の適応機構の研究. *細胞* 27: 488-493.
26. 藤川清三・鈴木利明・石川豊治・桜井滋賢 (1989) 走査電子顕微鏡に適用したクライオシステムの開発と生物試料への応用. *日本電子ニュース* 29: 2-5.
27. Fujita, M., Nakagawa, K., Mori, N. and Harada, H. (1978) The season of tylosis development and changes in parenchyma cell structure in *Robinia pseudoacacia* L. *Bulletin of the Kyoto University Forests* 50: 183-190.
28. 船田 良 (1997) 樹木の木部細胞壁形成における表層微小管の役割. 共焦点レーザ走査顕微鏡の応用. *電子顕微鏡* 32: 95-99.
29. 古川郁夫・世古口昌子・松田雅子・作野友康・岸本 潤 (1983) 小径広葉樹の材質 (第 2 報) 小径広葉樹 71 種の繊維長および道管要素長の水

平変動. 広葉樹研究 (鳥取大学農学部広葉樹開発実験室) 2: 103-134.

30. Gibbs, R. D. (1958) Patterns in the seasonal water content of trees. In K. V. Thimann, ed, The physiology of forest trees. The Ronald Press Co., New York, pp 43-69.
31. Grace, J. (1993) Refilling of embolized xylem. In M. Borghetti, J. Grace and A. Raschi eds, Water transport in plants under climatic stress. Cambridge University Press, Cambridge, pp 52-62.
32. Granier, A., Anfodillo, T., Sabatti, M., Cochard, H., Dreyer, E., Tomasi, M., Valentini, R. and Bréda, N. (1994) Axial and radial water flow in the trunks of oak trees: a quantitative and qualitative analysis. Tree Physiology 14: 1383-1396.
33. Greenidge, K. N. H. (1957a) Ascent of sap. Annual Review of Plant Physiology 8: 237-257.
34. Greenidge, K. N. H. (1957b) Rates and patterns of moisture movement in trees. In K. V. Thimann, ed, The physiology of forest trees. The Ronald Press Co., New York, pp 19-41.
35. Hacke, U. and Sauter, J. J. (1996a) Xylem dysfunction during winter and recovery of hydraulic conductivity in diffuse-porous and ring-porous trees. Oecologia 105: 435-439.
36. Hacke, U. and Sauter, J. J. (1996b) Drought-induced xylem dysfunction in petioles, branches, and roots of *Populus balsamifera* L. and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Plant Physiology 111: 413-417.
37. Hallgren, S. W., Rüdinger, M and Steudle, E. (1994) Root hydraulic properties of spruce measured with the pressure probe. Plant and Soil 167: 91-98.
38. Hammel, H. T. (1967) Freezing of xylem sap without cavitation. Plant Physiology. 42: 55-66.
39. Heine, R. W. (1971) Hydraulic conductivity in trees. Journal of

Experimental Botany 22: 503-511.

40. Higgs, K. H. and Wood, V. (1995) Drought susceptibility and xylem dysfunction in seedlings of 4 European oak species. *Annales des Sciences Forestieres*. 52: 507-513.
41. 平沢 正 (1998) 根の受動的吸水と能動的吸水. 根の辞典編集委員会編, 根の辞典. 朝倉書店, 東京, pp 350-352.
42. 北海道大学農学部 (1996, 1997) 北海道大学農学部附属農場気象観測報告. 北海道大学, 札幌.
43. 北方林業会 (1981) 北海道の樹種とその学名. 北方林業会, 札幌.
44. Hora, B. (1981) Redwoods (genera *Metasequoia*, *Sequoiadendron*, *Sequoia*). In B. Hora, ed, The oxford encyclopedia of trees of the world. Oxford University Press, Oxford, pp 82-83.
45. Humphrey, C. D. and Pittman, F. E. (1974) A simple methylene blue-azure II -basic fuchsin stain for expoxy-embedded tissue sections. *Stain Technology* 49: 9-14.
46. 池田武文 (1994) 樹木に発生するキャビテーションのアコースティック・エミッション法による検出. *日本林学会誌* 76: 364-366.
47. Ikeda, T. and Suzaki, T. (1984a) Influence of pine-wood nematodes on hydraulic conductivity and water status in *Pinus thunbergii*. *Journal of Japanese Forestry Society* 66: 412-420.
48. Ikeda, T. and Suzaki, T. (1984b) Distribution of xylem resistance to water flow in stems and branches of hardwood species. *Journal of Japanese Forestry Society* 66: 229-236.
49. 今川一志・石田茂雄 (1972) 樹木の木部形成に関する研究. II. ハリギリ (*Kalopanax pictus*) の春材道管の発達. 北海道大学農学部演習林研究報告 29 : 55-72.
50. 石田茂雄・大谷 諄 (1966) 広葉樹の多湿心材について (第 3 報). 多

湿心材樹としてのハルニレの立木樹幹内圧（流体圧）の測定. 第 16 回
日本木材学会大会研究発表要旨集. 福岡, p 35.

51. 石田茂雄・大谷 諄・川原田徹 (1976) 走査電子顕微鏡によるチロースの研究 (第 2 報). ハリエンジュのチロースの発達 その年次的・季節的観察. 日本木材学会北海道支部講演集 8: 6-9.
52. 石田茂雄・大谷 諄・黒沢厚基・今川一志 (1967) 超軟 X 線による木材内部構造に関する一研究. 北海道大学農学部演習林研究報告 25: 35-60.
53. 岩立朋子・船田 良・大谷 諄 (1998) ヤチダモ樹幹における孔圏道管の形成開始様式. 第 48 回日本木材学会大会研究発表要旨集. 静岡, p 544.
54. Jackson, G. E. and Grace, J. (1996) Field measurements of xylem cavitation: are acoustic emission useful? *Journal of Experimental Botany* 47: 1643-1650.
55. Jackson, G. E., Irvine, J. and Grace, J. (1995) Xylem cavitation in Scots pine and Sitka spruce saplings during water stress. *Tree Physiology* 15: 783-790.
56. Kavanagh, K. L. and Zaerr, J. B. (1997) Xylem cavitation and loss of hydraulic conductance in western hemlock following planting. *Tree Physiology* 17: 59-63.
57. 北村四郎・村田 源 (1971) 原色日本植物図鑑木本編 I. 保育社, 大阪.
58. 北村四郎・村田 源 (1979) 原色日本植物図鑑木本編 II. 保育社, 大阪.
59. Kolb, K. J. and Davis, S. D. (1994) Drought tolerance and xylem embolism in co-occurring species of coastal sage and chaparral. *Ecology* 75: 648-659.
60. 今 誠・深沢和三 (1985) 超軟 X 線による生材水分分布の調査. 日本木材学会北海道支部講演集 17: 41-44.
61. Kozlowski, T. T. (1958) Water relations and growth of trees. *Journal of Forestry* 56: 498-502.

62. Kozlowski, T. T. (1961) The movement of water in trees. *Forest Science* 7: 177-192.
63. Kozlowski, T. T. and Winget, C. H. (1963) Patterns of water movement in forest trees. *Botanical Gazette* 124: 301-311.
64. Kramer, P. J. (1939) The forces concerned in the intake of water by transpiring plants. *American Journal of Botany* 26: 784-791.
65. Kramer, P. J. (1983) *Water relations of plants*. Academic Press, New York.
66. Kramer, P. J. and Kozlowski, T. T. (1960) *Physiology of trees*. McGraw-Hill Book Co., New York.
67. Kuchenbrod, E., Landeck, M., Thürmer, F., Haase, A. and Zimmermann, U. (1996) Measurement of water flow in the xylem vessels of intact maize plants using flow-sensitive NMR imaging. *Botanica Acta* 109: 184-186.
68. Kuroda, K., Ohtani, J. and Fujikawa, S. (1997) Supercooling of xylem ray parenchyma cells in tropical and subtropical hardwood species. *Trees* 12: 97-106.
69. 黒田克史 (1998) 広葉樹木部放射柔細胞の氷点下温度への適応に関する研究. 博士論文. 北海道大学, 札幌.
70. 黒田克史・大谷 諄・藤川清三 (1997) 樹木木部放射柔細胞の凍結適応機構の変遷. *低温生物工学会誌* 43: 99-111.
71. Kuroda, K. (1990) Terpenoids causing tracheid-cavitation in *Pinus thunbergii* infected by the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55: 170-178.
72. Kuroda, K. (1991) Mechanism of cavitation development in the pine wilt disease. *European Journal of Forest Pathology* 21: 82-89.

73. Kuroda, K., Yamada, T., Mineo, K. and Tamura, H. (1988) Effect of cavitation on the development of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 54: 606-615.
74. 黒田慶子 (1990a) マツノザイセンチュウ感染によるマツの枯損機構. *植物防疫* 44: 539-542.
75. 黒田慶子 (1990b) マツ材線虫病の発病および病徴進展にかかわる通水阻害. *日本農芸化学会誌* 64: 1258-1261.
76. 黒田慶子・山田利博・伊藤進一郎 (1991) アカマツにおけるマツ材線虫病の進行と通水異常. *日本林学会誌* 73: 69-72.
77. Langan, S. J., Ewers, F. W. and Davis, S. D. (1997) Xylem dysfunction caused by water stress and freezing in two species of co-occurring chaparral shrubs. *Plant Cell and Environment* 20: 425-437.
78. Lewis, A. M. and Berg, A. C. (1996) A status report on intertracheid pits and the initiation of embolisms in the wood of *Thuja occidentalis* L. *IAWA Journal* 17: 257.
79. Lewis, A. M., Harnden, V. D. and Tyree, M. T. (1994) Collapse of water-stress emboli in the tracheids of *Thuja occidentalis* L. *Plant Physiology* 106: 1639-1646.
80. 李 起泳・深沢和三・氏家雅男 (1985) ヤマナラシ, ウラジロハコヤナギ, ドロノキの水食い材. *日本木材学会北海道支部講演集* 17: 45-48.
81. LoGullo, M. A. and Salleo, S. (1991) Three different methods of measuring xylem cavitation and embolism: A comparison. *Annals of Botany* 67: 417-424.
82. LoGullo, M. A. and Salleo, S. (1993) Different vulnerabilities of *Quercus ilex* L. to freeze- and summer drought-induced xylem embolism: an ecological interpretation. *Plant Cell and Environment*

- 16: 511-519.
83. Lybeck, B. R. (1959) Winter freezing in relation to the rise of sap in tall trees. *Plant Physiology* 34: 482-486.
84. Magnani, F. and Borghetti, M. (1995) Interpretation of seasonal changes of xylem embolism and plant hydraulic resistance in *Fagus sylvatica*. *Plant Cell and Environment* 18: 689-696.
85. 増田芳雄 (1977) 植物生理学. 培風館, 東京.
86. McCully, M. E., Huang, C. X. and Ling, L. E. C. (1998) Daily embolism and refilling of xylem vessels in the roots of field-grown maize. *New Phytologist* 138: 327-342.
87. Merwin, H. E. and Lyon, H. (1909) Sap pressure in the birch stem. *Botanical Gazette* 48: 442-458.
88. Milburn, J. A. (1970) Cavitation and osmotic potentials of *Sordaria* ascospores. *New Phytologist* 69: 133-141.
89. Milburn, J. A. (1973) Cavitation in *Ricinus* by acoustic detection: Induction in excised leaves by various factors. *Planta* 110: 253-265.
90. Milburn, J. A. (1991) Cavitation and embolism in xylem conduits. In A. S. Raghavendra, ed, *Physiology of trees*. A Wiley-Interscience Publication, New York, pp 163-174.
91. Milburn, J. A. (1993) Cavitation. A review: past, present and future. In M. Borghetti, J. Grace and A. Raschi, eds, *Water transport in plants under climatic stress*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 14-26.
92. Milburn, J. A. and O'Malley, P. E. R. (1984) Freeze-induced sap absorption in *Acer pseudoplatanus*: a possible mechanism. *Canadian Journal of Botany* 62: 2101-2106.

93. 宮田 生・佐伯 浩 (1984) 広葉樹木部における水分の通導と繊維の壁孔の変化. 第 34 回日本木材学会大会研究発表要旨集. 名古屋, p 336.
94. 森川 靖・佐藤 明 (1976) 幹の樹液量速度と樹冠部の木部圧ポテンシャル. 日本林学会誌 58 : 11-14.
95. 森川 靖・佐藤大七郎 (1978) 水. 佐藤大七郎・堤利夫編, 樹木. 形態と機能. 文永堂, 東京, pp 145-165.
96. 森川 靖・丸山 温 (1987) 生長と水. 畑野健一・佐々木恵彦編, 樹木の生長と環境. 養賢堂, 東京, pp 297-330.
97. 大井次三郎 (北川政夫改訂) (1983) 新日本植物誌顕花篇. 至文堂, 東京.
98. Ohtani, J. and Fujikawa, S. (1990) Cryo-SEM observation on vessel lumina of a living tree: *Ulmus davidiana* var. *Japonica*. IAWA Bulletin New Series 11: 183-194.
99. Ohtani, J. and Ishida, S. (1976) An observation of perforation plate differentiation in *Fagus crenata* Bl. using scanning electron microscopy. Research Bulletins of the College Experiment Forests, College of Agriculture, Hokkaido University 33: 115-126.
100. O'Malley, P. E. R. and Milburn, J. A. (1983) Freeze-induced fluctuations in xylem sap pressure in *Acer pseudoplatanus*. Canadian Journal of Botany 61: 3100-3106.
101. Peel, A. J. (1965) On the conductivity of the xylem in trees. Annals of Botany 29: 119-130.
102. Pockman, W. T. and Sperry, J. S. (1997) Freezing-induced xylem cavitation and the northern limit of *Larrea tridentata*. Oecologia 109: 19-27.
103. 佐道 健 (1985) 水分移動. 伏谷賢美・木方洋二・岡野 健・佐道 健・竹村富男・則元 京・有馬孝禮・堤 壽一・平井信之共著, 木材の物理. 文永堂, 東京, pp 42-56.

104. 酒井 昭 (1965) 越冬中の木の温度変化 (Ⅱ). 日本林学会誌 47: 444-447.
105. 酒井 昭・和田実男 (1963) 越冬中の木の温度変化. 低温科学 生物篇. 21: 25-39.
106. Saitoh, T., Ohtani, J., and Fukazawa, K. (1993) The occurrence and morphology of tyloses and gums in the vessels of Japanese hardwoods. IAWA Journal 14: 359-371.
107. 斉藤智子 (1993) 日本産主要広葉樹のチロースとゴム様物質の組織学的研究. 修士論文. 北海道大学農学部林産学科, 札幌.
108. Sano, Y., Fujikawa, S. and Fukazawa, K. (1995) Detection and features of wetwood in *Quercus mongolica* var. *grosseserrata*. Trees 9: 261-268.
109. Sano, Y. and Fukazawa, K. (1994) Structural variations and secondary changes in pit membranes in *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. IAWA Journal 15: 283-291.
110. 佐野雄三 (1996) 樹木の凍裂発生要因の研究. 北海道大学農学部邦文紀要 19: 565-648.
111. 佐野雄三・藤川清三 (1995) cryo-SEM による樹木細胞の水の観察法について. 日本木材学会北海道支部講演集 27: 47-50.
112. 佐野雄三・藤川清三・深沢和三 (1993) 樹木の凍裂発生機構の研究. 凍結及び乾燥研究会会誌 39: 13-21.
113. 札幌管区气象台 (1994, 1995) 北海道気象月報. 札幌管区气象台.
114. 佐藤 明・森川 靖 (1976) ふたつの斜面に生育するスギ林分における木部圧ポテンシャルの日経過. 日本林学会誌 58: 321-327.
115. 佐藤 明 (1977) スギ幼齢木の木部圧ポテンシャルの日経過と季節変化. 日本林学会誌 59: 293-297.

116. Schneider, H. (1981) Plant anatomy and general botany. In G. Clark, ed, Staining procedures. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 315-334.
117. Schneider, H., Zhu, J. J. and Zimmermann, U. (1997) Xylem and cell turgor pressure probe measurements in intact roots of glycophytes: transpiration induces a change in the radial and cellular reflection coefficients. *Plant Cell and Environment* 20: 221-229.
118. Scholander, P. F. (1958) The rise of sap in lianas. In K. V. Thimann, ed, The physiology of forest trees. The Ronald Press, New York, pp 3-17.
119. Scholander, P. F., Hammel, H. T., Bradstreet, E. D. and Hemmingsen, E. A. (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
120. Scholander, P. F., Love, W. E. and Kanwisher, J. W. (1955) The rise of sap in tall grapevines. *Plant Physiology* 30: 93-104.
121. Scholander, P. F., Ruud, B. and Leivestad, H. (1957) The rise of sap in a tropical liana. *Plant Physiology* 32: 1-6.
122. Slatyer, R. O. and Taylor, S. A. (1960) Terminology in plant- and soil-water relations. *Nature* 187: 922-924.
123. Sperry, J. S. (1985) Xylem embolism in the palm *Rhapis excelsa*. *IAWA Bulletin New Series* 6: 283-292.
124. Sperry, J. S. (1986) Relationship of xylem embolism to xylem pressure potential, stomatal closure, and shoot morphology in the palm *Rhapis excelsa*. *Plant Physiology* 80: 110-116.
125. Sperry, J. S. (1993) Winter xylem embolism and spring recovery in *Betula cordifolia*, *Fagus grandifolia*, *Abies balsamea* and *Picea rubens*. In M. Borghetti, J. Grace and A. Raschi, eds, Water transport in plants under climatic stress. Cambridge University Press, Cambridge, pp 86-98.

126. Sperry, J. S., Donnelly, J. R. and Tyree, M. T. (1988b) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell and Environment* 11: 35-40.
127. Sperry, J. S., Donnelly, J. R. and Tyree, M. T. (1988c) Seasonal occurrence of xylem embolism in sugar maple (*Acer saccharum*). *American Journal of Botany* 75: 1212-1218.
128. Sperry, J. S., Holbrook, N. M., Zimmermann, M. H. and Tyree M. T. (1987) Spring filling of xylem vessels in wild grapevine. *Plant Physiology* 83: 414-417.
129. Sperry, J. S., Nichols, K. L., Sullivan, J. E. M. and Eastlack, S. E. (1994) Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous and coniferous trees of northern Utah and interior Alaska. *Ecology* 75: 1736-1752.
130. Sperry, J. S. and Sullivan, J. E. M. (1992) Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. *Plant Physiology* 100: 605-613.
131. Sperry, J. S. and Tyree, M. T. (1988) Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology* 88: 581-587.
132. Sperry, J. S., Tyree, M. T. and Donnelly, J. R. (1988a) Vulnerability of xylem to embolism in a mangrove vs an inland species of Rhizophoraceae. *Physiologia Plantarum* 74: 276-283.
133. Steudle, E. (1994) Water transport across roots. *Plant and Soil* 167: 79-90.
134. Steudle, E. (1995) Trees under tension. *Nature* 378: 663-664.
135. Sucoff, E. (1969) Freezing of conifer xylem and the cohesion-tension theory. *Physiologia Plantarum* 22: 424-431.

136. Suzuki, M., Yoda, K. and Suzuki, H. (1996) Phenological comparison of the onset of vessel formation between ring-porous and diffuse-porous deciduous trees in a Japanese temperate forest. *IAWA Journal* 17: 431-444.
137. 高橋邦秀 (1976) 樹木の水分状態の測定法. プレッシャーチャンバーの紹介. 北方林業 28: 322-326.
138. 寺沢 実 (1996) 樹液の活用. 伐採なき林業・林産業. 山林 1343: 40-51.
139. Tsuda, M. and Tyree, M. T. (1997) Whole-plant hydraulic resistance and vulnerability segmentation in *Acer saccharinum*. *Tree Physiology* 17: 351-357.
140. Tyree, M. T., Alexander, J. and Machad, J. L. (1992) Loss of hydraulic conductivity due to water stress in intact juveniles of *Quercus rubra* and *Populus deltoides*. *Tree Physiology* 10: 411-415.
141. Tyree, M. T. and Cochard, H. (1996) Summer and winter embolism in oak: impact on water relations. *Annales des Sciences Forestieres* 53: 173-180.
142. Tyree, M. T., Davis, D. D. and Cochard, H. (1994) Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA Journal* 15: 335-360.
143. Tyree, M. T. and Dixon, M. A. (1983) Cavitation events in *Thuja occidentalis* L.? *Plant Physiology* 72: 1094-1099.
144. Tyree, M. T. and Dixon, M. A. (1986) Water stress induced cavitation and embolism in some woody plants. *Physiologia Plantrarum* 66: 397-405.
145. Tyree, M. T., Dixon, M. A. and Thompson, R. G. (1984a) Ultrasonic acoustic emissions from the sapwood of *Thuja occidentalis* measured inside a pressure bomb. *Plant Physiology* 74: 1046-1049.

146. Tyree, M. T., Dixon, M. A., Tyree, E. L. and Johnson, R. (1984b) Ultrasonic acoustic emissions from the sapwood of cedar and hemlock. *Plant Physiology* 75: 988-992.
147. Tyree, M. T., Fiscus, E. L., Wulschleger, S. D. and Dixon, M. A. (1986) Detection of xylem cavitation in corn under field conditions. *Plant Physiology* 82: 597-599.
148. Tyree, M. T. and Sperry, J. S. (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 19-38.
149. 内海泰弘 (1994) ヤチダモ若齢木における木部水分分布の季節変動. 卒業論文. 北海道大学農学部林産学科, 札幌.
150. 内海泰弘・佐野雄三・大谷 諄・深沢和三 (1994) ヤチダモ若齢木辺材の水分分布の季節的変動. *日本木材学会北海道支部講演集* 26: 9-12.
151. Wiegand, K. M. (1906) Pressure and flow of sap in the maple. *American Naturalist* 11: 409-453.
152. Wulschleger, S. D., Hanson, P. J. and Tschaplinski, T. J. (1998) Whole-plant water flux in understorey red maple exposed to altered precipitation regimes. *Tree Physiology* 18: 71-79.
153. Xia, Y., Sarafis, V., Campbell, E. O. and Callaghan, P. T. (1993) Non invasive imaging of water flow in plants by NMR microscopy. *Protoplasma* 173: 170-176.
154. Yazawa, K. and Ishida, S. (1965a) On the wet-heartwood of some broad-leaved trees grown in Japan II. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 54: 123-136.
155. Yazawa, K. and Ishida, S. (1965b) On the existence of the intermediate wood in some broad-leaved trees grown in Hokkaido, Japan. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 54: 137-160.

156. Yazawa, K., Ishida, S. and Miyajima, H. (1965) On the wet-heartwood of some broad-leaved trees grown in Japan I. Mokuzai Gakkaishi 11: 71-76.
157. 矢沢亀吉 (1960) 広葉樹とくにブナ立木の季節別ならびに辺・心材別の生材含水率. 木材学会誌 6: 170-175.
158. 矢沢亀吉 (1964) 樹幹内での含水率の分布. 北方林業 187: 309-314.
159. 矢沢亀吉・宮島 寛・丹 貞雄 (1963) 山火跡におけるダケカンバ再生林の生長とその材の理学的性質. 木材学会誌 9: 66-72.
160. Zang, D., Beadle, C. L. and White, D. A. (1996) Variation of sapflow velocity in *Eucalyptus globulus* with position in sapwood and use of a correction coefficient. Tree Physiology 16: 697-703.
161. Zimmermann, G., Zhu, J. J., Benkert, R., Schneider, H., Thürmer, F. and Zimmermann, U. (1995c) Xylem pressure measurements in intact laboratory plants and excised organs: A critical evaluation of methods in the literature and the xylem pressure probe. In M. Terazawa, C. A. McLeod and Y. Tamai, eds, Tree sap. Hokkaido University Press, Sapporo, pp 59-70.
162. Zimmermann, M. H. (1964) Effect of low temperature on ascent of sap in trees. Plant Physiology 39: 568-572.
163. Zimmermann, M. H. (1965) Water movement in stems of tall plants. In Symposia of the society for experimental biology. The state and movement of water in living organisms. Cambridge University Press, Cambridge, pp 151-155.
164. Zimmermann, M. H. (1983) Xylem structure and the ascent of sap. Springer-Verlag, Berlin.
165. Zimmermann, M. H. and Brown C. L. (1971) Trees. Structure and function. Spring-Verlag, Berlin.

166. Zimmermann, U., Bentrup, F. W. and Hasse, A. (1995a) Xylem pressure, flow, and sap composition of trees determined by means of the xylem pressure probe. In M. Terazawa, C. A. McLeod and Y. Tamai, eds, Tree sap. Hokkaido University Press, Sapporo, pp 47-58.
167. Zimmermann, U., Meinzer, F. and Bentrup, F. W. (1995b) How does water ascend in tall trees and other vascular plants? *Annals of Botany* 76: 545-551.

196. Zimmermann, U., Beikirch, F. W. and Hesse, A. (1955) Xylem pressure, flow, and sap composition of trees determined by means of the xylem pressure probe. In M. Terzaghi, G. A. McLeod and Y. Tsigal, eds. Tree sap. Hokkaido University Press, Sapporo, pp 47-58.

197. Zimmermann, U., Meinzer, F. and Beikirch, F. W. (1955b) How does water ascend in tall trees and other vascular plants? *Annals of Botany* 75: 545-551.

