



Title	北方針葉樹トロマツの低温への適応 : 耐凍性獲得のタイミングと遺伝的変異
Author(s)	石塚, 航; 小野, 清美; 原, 登志彦 他
Citation	低温科学, 0073, 81-92
Issue Date	2015-03-31
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.73.81
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59077
Type	departmental bulletin paper
File Information	85-96.pdf



北方針葉樹トドマツの低温への適応： 耐凍性獲得のタイミングと遺伝的変異

石塚 航¹⁾, 小野 清美²⁾, 原 登志彦²⁾, 後藤 晋³⁾

2014 年 11 月 22 日受付, 2015 年 1 月 28 日受理

冬期の気候が寒冷な北方林に生育する常緑樹木は、その厳しい環境を耐え抜くために十分な耐凍性を有する必要がある、耐凍性獲得と呼ばれる季節的な応答を示す。この耐凍性獲得タイミングには凍害回避と成長の間のフェノロジカル・トレードオフが存在すると考えられ、植物の応答タイミングは生育する環境の中で受容する環境シグナルをもとに適切に調節されていると推察される。モデルアプローチによって、気温変動を利用したシグナルで耐凍性獲得の調節機構と、そこに内在する遺伝的変異とを定量的に評価することができるようになってきた。

Adaptation to cold temperature of sub-boreal conifer, *Abies sachalinensis*: the timing of cold hardening and its intraspecific variation

Wataru Ishizuka¹, Kiyomi Ono², Toshihiko Hara², Susumu Goto³

In boreal forests with cold winters, evergreen coniferous species must develop adequate freezing tolerance to survive in the severe climate. Such species show autumn cold hardening as a seasonal acclimation response. It is important that the cold hardening occurs at a suitable time in each local climate, but there is a phenological trade-off between later hardening, which lengthens the active growth period, and earlier hardening, which avoids frost damage. Various kinds of environmental signals that vary locally might regulate hardening in plants. A modeling approach can extend our knowledge of the relationship between temperature-related signals and plants' ontogenetic development of autumn cold hardiness, thereby enabling us to quantify intraspecific variations in freezing tolerance.

キーワード：耐凍性獲得, 低温馴化, トドマツ, 遺伝変異, 標高変異
cold hardening, cold acclimation, *Abies sachalinensis*, intraspecific variation, elevation dependent variation

1. はじめに

北方域は冬期に氷点下に達する厳しい気候を有するため、ここに生育する植物は生育に不適な氷点下でも生存する仕組みを長い進化の中で発達させてきた (Kozłowski and Pallardy, 2002)。もしも自身の細胞が凍結した場合、凍結 (氷の生成) によって細胞の構造が物理的に破壊されるため、個体、または個体の一部が壊死に至る現象、すなわち凍害が引き起こされる。秋になると落葉し、翌春に新しく芽吹く落葉のメカニズムは、そのような冬期の厳しい寒冷環境を避ける北方林樹木の典型的な適応戦略である。一方、北方林の樹木の中には、一年を通して着葉したままにいる常緑樹もみられる。常緑樹は主に高木針葉樹においてみられ、とくに冬期に北方林に踏み入ったときに際立って観察することができる (図

連絡先

石塚 航

林業試験場 森林資源部

Tel. 0126-63-4164

e-mail: wataru.ishi@gmail.com

1) 北海道立総合研究機構林業試験場

Forestry Research Institute, Hokkaido Research Organization

2) 北海道大学低温科学研究所

Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

3) 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林

The University of Tokyo Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo

1a). 常緑樹の場合, 生育環境によってはマイナス何十°Cという気温に葉を曝すことになるため, そのような環境下でも葉などの組織の致命的な凍結を防ぐ仕組みが必須となる. この仕組みとして組織・細胞レベルでの応答が知られ, 植物の耐凍性戦略としてまとめられている(藤川, 1996; Aitken and Hannerz, 2001; 酒井, 2003; Chen et al., 2006). たとえば, 耐凍性を高め, 維持するための, 植物の葉でみられる細胞レベルでの生理的・機能的変化が挙げられる. 生理的变化には, 秋までに貯蔵した澱粉を葉細胞内で分解し, さまざまな可溶性糖として蓄積することで細胞内糖濃度を高める応答があり, これは葉細胞の凍結防止に役立つ(藤川, 1996; 酒井, 2003). そのほか, 液胞の小胞化や細胞内の脱水, 細胞膜の流動化といった変化のほか, 厳寒な温度下では細胞外凍結を誘導するといった機能的な応答があるとされる. このような耐凍性を高める仕組みは, 凍害リスクが高まる前に完了する必要がある. そのため, 植物は秋期において, 徐々に耐凍性を高めていくという耐凍性獲得応答を示す(Aitken and Hannerz, 2001).

2. 耐凍性獲得タイミングとその予測

このような耐凍性獲得応答は, これから訪れる寒冷な環境に備えた適応的応答である一方で, 光合成成長の面からは必ずしも植物にとって有利な応答ではない. それは, 上述した葉の生理的・機能的変化が光合成生理活性の低下を同時にもたらすため, 耐凍性獲得に並行して光合成休止状態への移行が起こると考えられるからである(Kramer et al., 2000; Aitken and Hannerz, 2001). したがって, どのようなタイミングで耐凍性獲得応答を発現するかという, 応答の季節性(フェノロジーの1つ)が重要になる. 早いタイミングでの耐凍性獲得は, 当年における成長にとっては有利にならないものの, 凍害回避にとって有効なため, 凍害リスク(とりわけ冬期の早霜害リスク)の高い環境への適応に関わると考えられる. 一方, 耐凍性獲得タイミングが遅ければ, 成長期間の延長につながるため, 凍害リスクの低い環境への適応に関わると考えられる. これは凍害回避と成長との間のトレードオフとして説明され(Aitken and Hannerz, 2001; Vitasse et al., 2009; Chuine, 2010), とくに, 耐凍性獲得タイミングなど, 動的な季節的応答の中にトレードオフが認められる場合には, 「フェノロジカル・トレードオフ」とも呼ばれる(Chuine, 2010).

フェノロジカル・トレードオフが存在する場合, 季節的応答のタイミングには生育環境それぞれに対応して最適値が生じると予想される(Chuine, 2010). そのような例は北欧の古典的な研究にてすでに報告されており, 北方樹木の冬芽形成タイミング(秋の応答の1つ)には生育環境に応じた違いがあることが示されている

(Langret, 1963). フェノロジー応答が生育環境に応じて変わる動的な形質であることから, 植物が何らかの環境シグナルをもとにしたフェノロジーの調節機構を有していることを示唆する(Aikawa et al., 2010). これについても実証研究が古くから行われ, 季節的に変動する環境がシグナルの役割を担いうること, また, 適切な環境条件をもとに植物のフェノロジーを予測できることが指摘されている(Dormling et al., 1968). 予測の可否を検証するには, 候補となる環境シグナルを用いてモデルを構築するモデルアプローチが有効となる. そこで, 北方樹木を用いたこれまでの取り組みの中で, 複数のモデルが構築・検証され, フェノロジーの駆動因子として日長(長日条件や短日条件), 気温(低温, 高温や, 夜間最低気温), 水分(渇水, 湛水)などの様々な環境ストレスが報告された(Van den Droessche, 1970; Joly et al., 1989; Repo et al., 1990; Leinonen, 1996; Morgenstern, 1996; Greer et al., 2000; Kramer et al., 2000; Aitken and Hannerz, 2001; Linkosalo et al., 2006; Kohmann and Johnsen, 2007). たとえば, 夜の長さをモデルに組み込んだ日長応答モデルが構築され, 高緯度に至るまで広域に分布する北方樹木では, 緯度に応じて変わる日長が有効なシグナルとなること, 耐凍性獲得などの応答がこのモデルで良く説明できることが報告された(Dormling et al., 1968; Morgenstern, 1996; Kohmann and Johnsen, 2007). 同様に, 地域によって気温環境も大きく変わりうるため, 気温を組み込んだモデルも構築された. ただし, 気温は日内・日間変動が大きいため, この場合のモデルは単純ではない. そこで, 有効なモデルとして, 夜間の温度のみを使用したモデル(Repo et al., 1990)や, ある閾値を下回る低温を使用したモデル(Hänninen and Pelkonen, 1988; Greer et al., 2000)が構築された. 閾値を用いたモデルからはさらに, 低温シグナルを蓄積し, 一定の要求量を満たすことで応答を説明する低温要求機構を組み込んだ温度応答モデルが構築された(Timmis et al., 1994). このモデルはとくに野外における春期のフェノロジー(耐凍性解除や開芽, 開花)の予測に有効で, 低温の「蓄積」が有効な駆動因子になることが指摘されている(Cannell et al., 1985; Timmis et al., 1994; Hannerz, 1999; Chuine et al., 2003; Linkosalo et al., 2006; Hänninen et al., 2007; Aikawa et al., 2010). とくに Timmis et al. (1994) は, 秋の耐凍性獲得タイミング予測にも本モデルを適用し, 低温要求による植物の頑強なフェノロジー調節の可能性を示した. また, 複数の環境シグナルが相補的に作用している可能性を想定し, 上述の日長や気温をモデル内に組み込んだ動的モデルも構築され, より柔軟な応答予測も試みられている(Leinonen 1996; Kramer et al. 2000).

しかし, このような予測が同一種内で一意にできない

場合もある。たとえば、遺伝的変異など、環境以外の内在的要因によってフェノロジー応答が規定されている場合である。北方樹木の中には、生育環境に対して集団特異的な適応（局所適応）を示す種がいることも知られる（Savolainen et al., 2007；Mimura and Aitken, 2010；Ishizuka and Goto, 2012）。同一種内でも緯度や標高の異なる集団間で秋の耐凍性獲得といったフェノロジーに明瞭な遺伝的変異が認められることは、多くの北方林針葉樹で報告されており（Worrall, 1983；Rehfeldt, 1989；Morgenstern, 1996；Beuker et al., 1998；Oleksyn et al., 1998；Howe et al., 2003；Savolainen et al., 2004；Notivol et al., 2007），それが自生地への適応に関連していることを示した研究もある（Skrøppa and Magnussen, 1993；Mimura and Aitken, 2010）。緯度に沿った遺伝的変異の場合、フェノロジーの違いには日長シグナルに対する集団間の応答の差異が寄与していると指摘される（Morgenstern, 1996；Kohmann and Johnsen, 2007）。一方、標高に沿った遺伝的変異の場合には、標高間で大きく変わる気温が、標高間で一定の日長よりも重要だと言われる（Körner, 2007）。しかし、気温への応答機構の差異が集団間のフェノロジーの違いに寄与すると示唆した研究はあるものの（Worrall, 1983），気温に関連したシグナルは単純ではないため、どのような気温の応答機構がどの程度影響するかといった定量的な評価は十分ではない。温度応答モデルの有効性を指摘した Timmis et al. (1994) の研究においても、標高の異なる集団間でのパラメータの違いを検出するには至らなかった。ただし、明瞭な標高変異を示す材料をもとにモデルアプローチを行った Ishizuka et al. (2015) の研究では、温度応答モデルで耐凍性獲得タイミングを良く記述でき、モデルに組み込んだ温度関連シグナルの中に応答調節に関わる集団間変異が認められることが明らかになった。これによって、環境シグナルによるフェノロジー調節機構の中に遺伝的変異を仮定することの有効性が新たに提唱された（Ishizuka et al., 2015）。

そこで本稿では、著者らの最新事例（Ishizuka et al., 2015）をもとに、北方樹木の低温への適応、とくに耐凍性獲得タイミングの理解に向けたモデルアプローチと、想定される遺伝的変異の定量化の試みを紹介する。改変した温度応答モデルの説明をする中で、温度を中心として北方林の樹木集団がそれぞれどのような適応を発揮してきたか仮説を提示したい。

3. 研究事例の紹介

3.1 材料と凍結試験

本研究では常緑針葉樹でモミ属のトドマツ（*Abies sachalinensis*）を研究材料として用いた。本種はシベリアから北海道にかけて広域に分布し、また、北海道中央

部では低地帯（標高約 100 m）から標高約 1600 m にかけて幅広い垂直分布を示す。本種は北方林を構成する主要極相種で、冬期には着葉したまま高い耐凍性を発揮し、年間最低気温 -25°C にも達する寒冷な環境下でも生育することができる（図 1a）。また、北海道ではカラマツと並ぶ造林面積を誇り、林業的にも重要な樹種である。これまでの研究から本種が標高に沿って遺伝的変異を示すことが知られ、成長や生残（倉橋・濱谷, 1981；Goto et al., 2011；Ishizuka and Goto, 2012）、耐病性、耐鼠性といった生物害抵抗性（倉橋・濱谷, 1981；Saho et al., 1994）、最大耐凍度（Eiga and Sakai, 1984）といった形質において標高変異が検出されている。その中でも、1974 年より東京大学北海道演習林において実施されている標高間相互植栽試験は、本種の成長と生残にどれだけ遺伝的な影響と環境の影響があるか同時に評価し、自生標高域への適応を知る貴重な試験となっている（Ishizuka and Goto, 2012）。この試験では、北海道中央部にある富良野市の大麓山（1459 m）を舞台に、230 m から 1200 m までの標高傾度の中で標高の異なる 8 つの由来集団が設定され、それらを種子源として得た苗木が、同じ標高傾度内に標高別で設定した 6 つの植栽試験地へと植栽されている（倉橋・濱谷, 1981）。そこで本研究では、現存する標高間相互植栽試験を利用し、耐凍性獲得に関する遺伝的変異を調べることにした。本種の変異は標高域が離れた場合ほどより明瞭に観察できる（Ishizuka and Goto, 2012）。そこで、効率的に耐凍性関連形質を測定するため、分布標高域にまたがるように、現存個体数を加味しながら試験地・集団数のそれぞれ半数を選定し、本研究の対象として用いた。選定した試験地は 230 m 試験地、730 m 試験地、1100 m 試験地で、集団はそれぞれの試験地に生育する 340 m 集団、530 m 集団、930 m 集団、1200 m 集団とした（試験地名、集団名はそれぞれ、試験地が設定された標高、種子の由来する集団の生育する標高を付して示す）。さらに、それぞれの試験地において 1 集団あたり健全な 5~6 個体を試験材料に選び、これを反復処理として扱った。供試個体は合計で 65 個体となった（3 試験地 $\times$ 4 由来集団 $\times$ 5~6 個体）。これらの供試個体を用い、既存の方法（Eiga and Sakai, 1984；Lindgren and Hallgren, 1993）に沿った凍結試験を行った。なお、供試個体は試験を行った時点で 37 年生であった。

2010 年 10 月から 11 月にかけて供試個体を用いて時期別の凍結試験を行った。1 回の凍結試験は以下の手順で行われる；供試個体から日当たりのよい健康なシュート（枝）を採取する。1 年生枝（枝の先端）の全体が露出するように湿らせたロックウールに挿し、 5°C の暗室にて一晚静置する。 5°C より $2^{\circ}\text{C}/\text{時}$ の速度で温度を下げ、設定温度に達したらそのまま 4 時間暴露する。低温暴露の後、 $2^{\circ}\text{C}/\text{時}$ で 5°C に戻し、14 日間静置する。そ

の間, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射を行う明条件と光を照射しない暗条件とを 12 時間単位で繰り返す. 以上の凍結試験は北海道大学低温科学研究所において実施した. なお, 設定温度は試験地における年間最低気温よりもやや低い -30°C とした.

本種が十分な耐凍性を獲得する過程を評価するため, 凍結試験は約 2 週間おきに 3 回行い, 順に test 1, test 2, test 3 とした. それぞれにおけるシュートのサンプリング日は 2010 年 10 月 12 日, 26 日, 11 月 11 日であった. 凍結試験後, 本種を含む常緑針葉樹では針葉の褐色化が観察された (図 1b). 褐色化の程度は凍結処理による凍害の程度を示すことが知られる (Eiga and Sakai, 1984; Leinonen, 1996; Greer et al., 2000). そこで, 耐凍性を評価するため, 供試枝の 1 年生枝に着生する 1 年生葉の褐色割合を測定した. 測定は褐色した 1 年生葉の割合に基づいて, 0; 褐色した針葉なし (図 1b 右), 1; シュートの 1~25% の針葉が褐色化, 2; 26~

50% の針葉が褐色化, 3; 51~75% の針葉が褐色化, 4; 76% 以上, もしくは全ての針葉が褐色化 (図 1b 左), という 5 段階のスコア化によった. このスコア評価は, 例えばクロロフィル蛍光収率 (F_v/F_m 値) といった, より定量的な植物の光合成生理活性と密接な関係があり, 簡便で効率的な評価方法である (Lindgren and

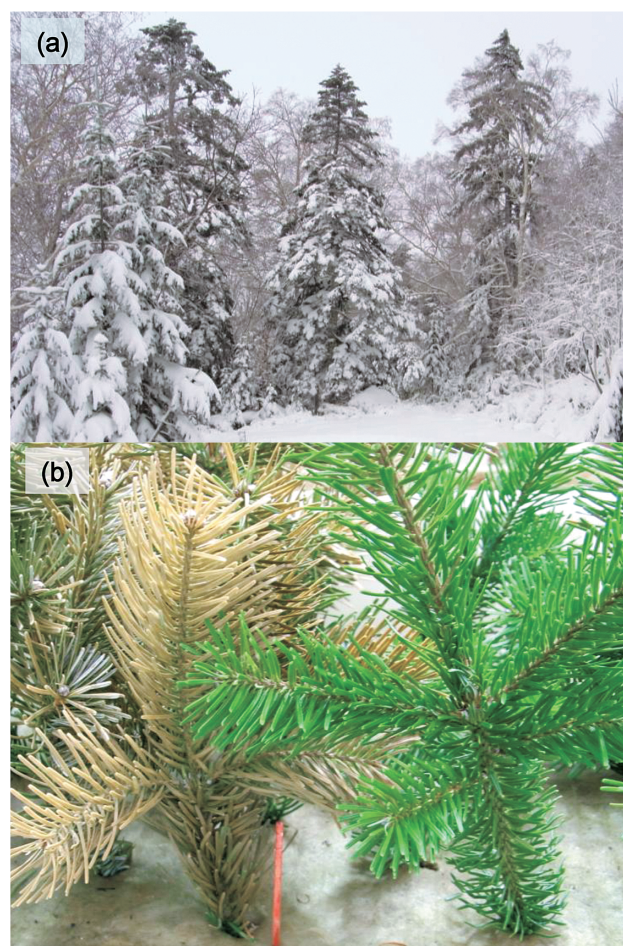


図 1: (a) 調査地の高標高域におけるトドマツ. 2010 年 11 月 11 日標高 1100 m にて撮影. (b) 凍結被害度の異なるシュート. 左が被害度 4 (枯死), 右が被害度 0 (健全) を示す.

Figure 1: (a) Study species, *Abies sachalinensis*, in high elevation area (1100 m a. s. l.) at 11th November, 2010. (b) Examples of shoot representing different scores of frost damage. The score of frost damage; 4 for left shoot (dead), 0 for right one (no damage).

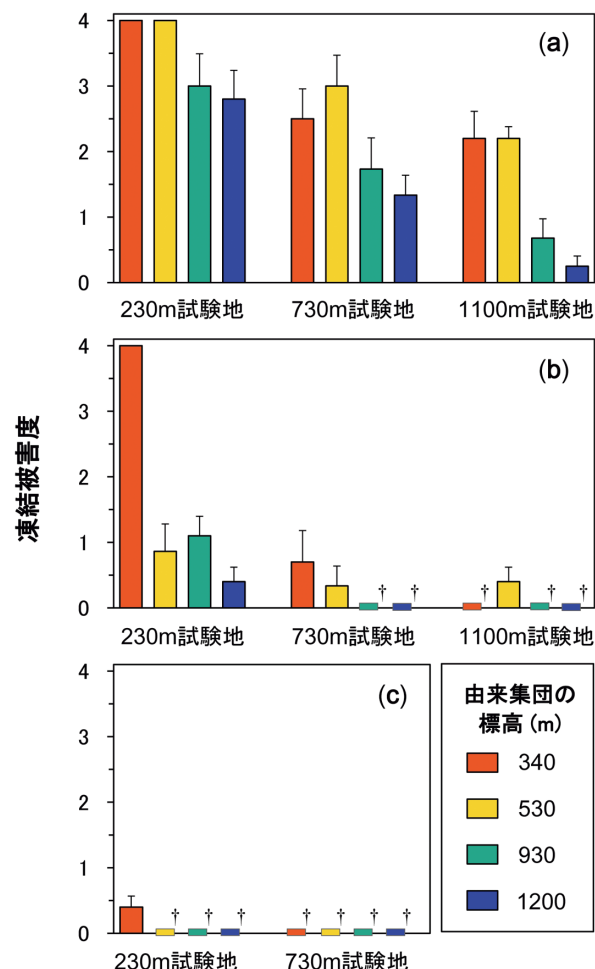


図 2: トドマツの標高別植栽試験生育個体を用いた, 時期別の植栽試験地, 由来集団ごとの凍結被害度. (a) test 1 (shoots sampled on 12 October), (b) test 2 (shoots sampled on 26 October), (c) test 3 (shoots sampled on 11 November). 各図内の被害度は, サンプルの由来集団の標高と, サンプルの生育する試験地の標高に沿って並べた. 同じ色のバーはサンプルの由来する集団が同じことを示す. test 3 では, 積雪により 1100 m 試験地の枝採集ができなかったためにデータがない. 値は供試サンプルの平均で, エラーバーは標準誤差. † はその集団の全サンプルで被害がみられなかった (凍結被害度=0) を示す. 転載許可を受け, Ishizuka et al. (2015) より改変して示した.

Figure 2: The score of needle freezing damage after a freezing test at -30°C of each testing population from three planting sites: (a) test 1 (shoots sampled on 12 October), (b) test 2 (shoots sampled on 26 October), (c) test 3 (shoots sampled on 11 November). The damage score is arrayed and colored according to the elevation of the planting sites and that of the tested populations. Data were absent in site 1100-m in test 3, due to the snow blockage. Error bars indicate SE. In the graph, undamaged populations are represented by † marks. Modified from Ishizuka et al. (2015) with permission.

Hallgren, 1993; Cunningham and Read, 2006). 本種でも同様に F_v/F_m 値と有意な相関が見出されている (Ishizuka et al., 2015). 本研究では以降、測定した針葉の褐色度を「凍結被害度」と呼ぶ。

供試個体の3回にわたる凍結試験の結果を図2に示す。試験回、試験地、由来集団の違いによって、凍結被害度の平均は0から4までばらついた。図2からは、試験回を経るほど凍結被害度が小さくなる、同じ試験回でも試験地の標高が高いほど凍結被害度が小さい、同じ試験地内でも由来集団の標高が高いほど凍結被害度が小さい、といった傾向が読み取れる。340 m 集団に着目すると、test 1 では230 m 試験地に生育する個体は -30°C の凍結処理で全て褐色となった(凍結被害度; 4)が、730 m 試験地、1100 m 試験地のそれはそれぞれ平均 2.5 ± 0.5 , 2.2 ± 0.4 と、ある程度の耐凍性があったことを示した。test 2 では、230 m 試験地の生育個体は被害度が4のまま変化なかったが、730 m 試験地のそれは平均 0.7 ± 0.5 , 1100 m 試験地のそれは全く褐色被害がみられず、被害度が全てで0となり、さらに耐凍性が高まったことを示した。test 3 では、230 m 試験地の生育個体においても被害度の低下がみられ、平均 0.4 ± 0.2 となり、また730 m 試験地のそれも褐色被害を示さず、この時点までに -30°C に対する耐凍性を十分に有していたことを示した。

凍結被害度に有意な試験回、試験地、由来集団の効果があつたことは、三元配置分散分析でも確かめられた (Ishizuka et al., 2015)。結果より、本種が秋期に徐々に耐凍性を高め、 -30°C にも耐えるようになること、その耐凍性獲得タイミングには環境の効果と遺伝の効果の両方が影響したことが示された。また、検出された遺伝的変異には、由来集団の標高が高いほど早く耐凍性を獲得するという標高クラインが認められ、試験地の標高が高いほど耐凍性獲得タイミングが早いという環境の効果と共通の標高効果のパターンを有していた。相互植栽の手法で、環境と遺伝の効果に共通の傾向(クライン)が検出できれば、自生環境に対する適応的な変異が存在する証拠になるとされる (Bayrs et al., 2007)。すなわち、本研究の結果は、標高に沿った耐凍性獲得タイミングの変異が標高適応に関連した形質であったことを示唆している。

実際、北方域に生育する他のモミ属樹木やマツ属樹木 (*Pinus*)、トウヒ属樹木 (*Picea*) やトガサワラ属樹木 (*Pseudotsuga*) を用いた既往研究においても、野外の気温低下、もしくは日長変化にตอบสนองし、時間の経過とともに段階的に耐凍性を高めていく応答が知られている (Worrall, 1983; Timmis et al., 1994; Aitken and Hannerz, 2001; Bigras et al., 2001; Savolainen et al., 2004)。また、この応答には生育環境に対応した種内の遺伝的変異があることも指摘されている (Rehfeldt,

1989; Skrøppa and Magnussen, 1993; Mimura and Aitken, 2010)。とくに Rehfeldt (1989) は、トガサワラ属一種 (*P. menziesii* var. *glauca*) を用いた解析から、耐凍性が高いほど成長量が劣るという耐凍性獲得と成長との間の負相関が、標高の異なる集団の間に見出せることを報告し、標高適応に関わることを指摘した。寒冷で早期の霜害リスクが高い自生環境下、すなわち高標高や高緯度環境、では早い耐凍性獲得が有利な一方、霜害リスクが低い環境下では成長に費やし耐凍性獲得が遅いほうが有利なため、タイミングの変異は生育する環境への進化的適応の結果を示すと示唆される。トドマツが示した耐凍性獲得タイミングの遺伝的変異もそれらと矛盾していないと考えられた。

3.2 温度応答モデルの構築

上述したように、トドマツの秋期の耐凍性獲得タイミングは、試験地環境の違い、ならびに由来集団の違いに応じて変動したことが明らかになった。そこで、このような耐凍性獲得の過程をモデルによって評価し、より詳細に応答の調節機構を明らかにすることを試みた。同時に、本種の示す遺伝的変異は、調節機構のどのような部分の違いで説明されるのか、モデル内のパラメータ推定をもとに検証した。

植物の馴化プロセスを記述するモデルは複数あり、シグナルとなる外的要因が異なる。本研究の場合、比較的狭い地理スケール内の標高間で遺伝的変異がみられたことから、そのスケールでも変化しうるシグナルとして、日長ではなく、気温が有効だと想定された。そこで本研究では、温度応答モデルの適用を試み、さらにモデルを発展させて種内変異の推定ができるか検証した。各試験地の気温は、試験地内に設置したデータロガーにより1時間ごとに記録され、通年のデータが揃う (Ishizuka and Goto, 2012)。2009~2010年のデータによれば、230 m 試験地、730 m 試験地、1100 m 試験地の年平均気温はそれぞれ 6.53°C , 3.81°C , 1.99°C で、初めて氷点以下となった日はそれぞれ10月27日、19日、18日だった。また、試験地がある山腹斜面では、100 mの上昇ごとに 0.51°C の気温低下があると算出されている (Ishizuka and Goto, 2012)。モデルにはこれらの気象データを用いた。

構築する温度応答モデルの概略は図3に示す通りである。この温度応答モデルでは、季節的な気温変動の中から、とくに気温の低下といった温度シグナルを受けて植物の生理応答が進むというプロセスを仮定している。その最も重要な部分である気温への応答は図3a上図において表現される。気温には大きな季節変動があるものの、野外で観測される気温は、日長とは異なり、複雑な日内・日間変動を示すため、一時点の気温から季節を窺い知ることは非常に困難である (Aikawa et al., 2010)。

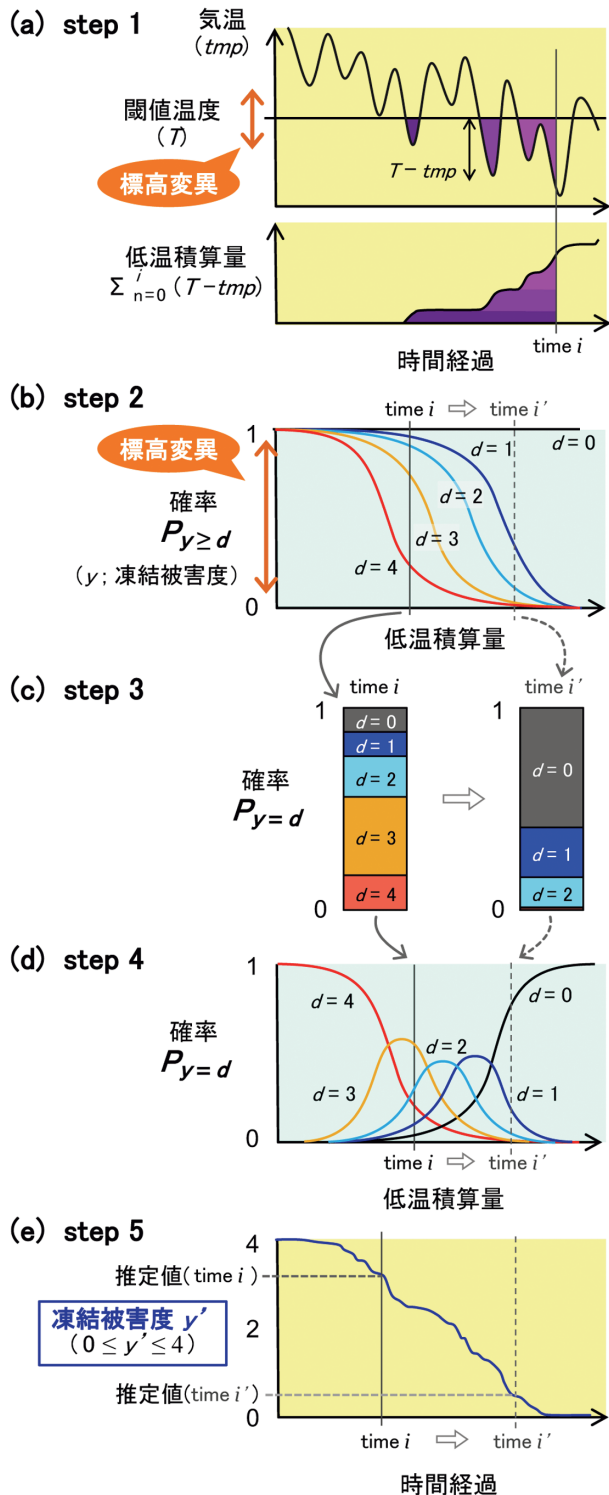


図3: 気温応答を用いたトドマツの凍結被害度予測モデルの概念図。(a) 秋期における時間別気温変化 (上図) と閾値温度をもとに蓄積される低温積算量の時間変化 (下図)。(b) 順序ロジスティックモデルが示す積算低温量と凍結被害度の確率の総和との関係。(c) 1時点における凍結被害度別の推定確率の算出。(d) 低温積算量と凍結被害度別確率の関係への変換。(e) 予測される凍結被害度の推移。凍結被害度は -30°C に曝された葉の被害度を示し、最大値4は葉がすべて褐変した状態。本モデルは時間の経過に伴って低温積算量が増加し、それにより耐凍性が高まる過程を想定した。同時に、モデル内の2パラメータにおいて標高変異を想定し、これらについても統計学的に検証した (本文参照)。転載許可を受け、Ishizuka et al. (2015) より改変して示した。

Figure 3: The concept of the modeling approach of plants' thermal response to predict the expected freezing damage of *Abies sachalinensis*. (a) The time series changes in the field air temperature in autumn (upper), the time series changes in the cumulative sum of chilling (lower). (b) The cumulative probability of the freezing damage estimated by the cumulative sum of chilling on the basis of an ordinal logistic model. (c) The probabilities of each of the scores of freezing damage at a given time-point. (d) Calculation of the probability of a particular freezing damage from graph b. (e) The development of cold hardiness on the basis of the decrease of the freezing damage. In the present study, two elevational variations were assumed in the models the genetic variations, and statistically examined. Modified from Ishizuka et al. (2015) with permission.

その転写調節領域でのヒストン修飾 (メチル化やアセチル化) とその維持機構が、一定期間内の気温シグナル蓄積の役割を担う、という制御機構である。本研究対象種においても同様に、直前までの気温シグナルを蓄積してタイミングを調節する機構があると考えた。温度応答モデルにおいては、ある閾値温度を下回る気温を「低温シグナル」として植物が受容し蓄積する、というプロセスで記述される。また、気温と閾値との差分によって受容するシグナルの大きさが記述される。図3aでは例として、ある閾値温度を下回る気温をとった期間が、ある時間 (time i) までに3回訪れた場合を模式的に示した。閾値以下の気温を経験することでその程度に応じた低温シグナルの蓄積があり、時間の経過とともに低温蓄積量が不規則に増加していく (図3a下図)。耐凍性はこの低温蓄積量によって決まると考えると、温度応答モデルは以下の関係式に従う；

$$y_i \sim \sum_{n=0}^i [(T - tmp_n) \times \theta_{(0,1)}] \quad (1)$$

式中、 y_i は時間 i における -30°C での凍結被害度 (0~4) で、耐凍性の程度を表す指標である。右辺は時間 i における低温蓄積量を表し、T が閾値温度、 tmp_n がある時間 n における気温、 θ が0か1をとる条件変数となる。 θ は、もしも気温が閾値温度よりも高ければ0、低ければ1をとり、閾値温度とある時間 n の気温との差分が低温シグナルとして蓄積されるかどうかを表す。したがって、気温が閾値温度よりも高い場合には差分は0となり、低温蓄積量は増加しない。この差分 (もしくは0値) を時間 i まで総和したものが右辺の変数となる。ただし、 y_i として用いた凍結被害度はスコア値な

しかし、植物には、複雑で予測しにくい気温をシグナルにして、適切なタイミングで生理応答するメカニズムが存在すると予想される。シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 草本を用いた Aikawa et al. (2010) による分子遺伝学的な実証研究では、植物がある一定期間前から直前までの温度シグナルを蓄積し、その多寡によって季節的応答 (ここでは開花応答) を調節していると指摘された。そのような調節はエピジェネティックな制御によって説明できると言われる (Schmits et al., 2008)。すなわち、表現型応答の発現に関与する DNA 領域、ないし

め、必ずしも数値間の間隔が一定とは限らない。そこで、目的変数 (y_i) が順序変数の場合に適切な解析ができる順序ロジスティックモデルをこの温度応答モデルに適用した (Frank and Harrell, 2001)。本モデルでは、順序変数 y が d 以上の値をとる確率を回帰する。そのため、変数間の間隔が一定でなくても柔軟なデータ分析を行うことができる。モデル式は誤差が二項分布に従うと仮定し、線形予測子はロジスティック式に基づくとして、以下のように記述される；

$$P_{y \geq d} = \text{logistic}(z_{y \geq d}) = \frac{\exp(z_{y \geq d})}{1 + \exp(z_{y \geq d})} \quad (2)$$

式中、 $P_{y \geq d}$ は y が d 以上となる確率 ($0 \leq P \leq 1$)、 z は説明変数を含んだ線形関数を示す (式構造は後述の (4) 式参照)。低温積算量をモデルの変数として与えた場合、出力結果は図 3b のようになる。モデルで仮定したすべての d に対して独立でパラメータ推定が行われるため、図に示すように、順序変数の性質に適合した柔軟な推定が可能である。このモデルの出力結果から、時間 i における凍結被害度別の推定確率 ($P_{y=d}$; $d=0, 1, 2, 3, 4$) を算出することができる (図 3c)。これは以下の式に基づく；

$$P_{y=d} = P_{y \geq d} - P_{y \geq (d+1)} \quad (3)$$

ただし、 d のとりうる範囲から、 $P_{y=4}$ は $P_{y \geq 4}$ と同値として扱った。このような、積算確率から個々の確率への分解を、とりうる時間 i すべてで行うことで図 3d の結果を得られる。この出力結果をもとに、0 から 4 の値を取りうる凍結被害度期待値 y' を、以下の式によって算出する；

$$y' = \sum_{d=0}^4 (d \times P_{y=d}) \quad (4)$$

これを取りうる時間 i すべてで行うことで、時間の経過に伴う凍結被害度の変化が得られる (図 3e)。たとえば、 i から i' に時間経過した場合に変化する凍結被害度をモデルから推定する。時間の経過に伴って低温積算量が増加するため、それに対応して図 3b の x 軸上の位置が移動する。その結果、凍結被害度別の推定確率の構成割合が変化する (図 3c, d)。そのため、それらをもとに算出される凍結被害度期待値も被害度が低くなる方へと移行し、リーズナブルな推定結果を得られると予想される。

3.3 遺伝的変異の仮定とモデルの選抜

続いて、温度応答モデルを改変し、変数内に集団間変異を組み込んだ。本研究では、以下の 2 つの応答の差によって集団間変異が説明できると考えた；閾値温度 T が集団間で異なる、耐凍性獲得に必要な低温要求量が集団間で異なる。また、集団間変異は、本種の遺伝変

異が明瞭な標高クラインを示していることから (図 2；Ishizuka and Goto, 2012)、標高の変数で記述できると想定した。2 つの候補変異のうち、前者は図 3a 内に示した通り、閾値温度の違いをモデルで直接推定する。後者については、低温要求量が異なることで低温積算量と凍結被害度確率との関係も変化することが予想されるため、図 3b 内に示した通り、モデル内に加えた変数で確率の違いを説明させて、間接的に推定することとした。したがって、改変した温度応答モデルは、(1)、(2) 式をもとに以下で表される；

$$\begin{cases} P_{hij, y \geq d} = \text{logistic}(z_{hij, y \geq d}) \\ z_{hij, y \geq d} = R_{h, y \geq d} + \{\alpha \times \sum_{n=0}^i [(T_h - tmp_{nj}) \times \theta_{(0,1)}]\} \\ R_{h, y \geq d} = \beta_d + (\gamma \times elv_h) \\ T_h = \delta + (\kappa \times elv_h) \end{cases} \quad (4)$$

式中、 α , β , γ , δ , κ の項がモデル解析によって推定する未知のパラメータ項である。 $P_{hij, y \geq d}$ は時間 i における、試験地 j の集団 h が示す被害度 d 以上の確率である。 $z_{hij, y \geq d}$ は (2) 式の通り線形関数で、低温要求量を規定する $R_{h, y \geq d}$ 項と低温蓄積量の項を持つ。モデル内の R , T 項はさらに、集団 h が由来する標高 (elv_h) の変数を持ち、これらから集団間変異が説明される。

(4) 式を用い、統計的にパラメータの推定を行うが、想定したすべてのパラメータが被害度に影響するとは限らないため、あらかじめ変数選択を行うこととした。AIC (赤池情報量規準) に基づき、最も AIC を低くするモデルを最適モデルとして採用し、パラメータを決めた (Johnson and Omeland, 2004)。また、モデルは階層構造をとり、一度に全パラメータセット (α , β , γ , δ , κ) の最尤推定ができなかったため、グリッドサーチと最尤法を併用することで変数選択とパラメータ推定を行った。その方法は以下の通りである。まず、(δ , κ) のパラメータを固定して残りのパラメータの最尤推定を行い、変数選択で不要なパラメータがあるか検証するとともに、このセットにおいて最も AIC を低くするモデルを出力させる。この試行を、実測値から逸脱しない範囲内で生成した任意の (δ , κ) 値に対して行う。 $\delta=0$, ないし $\kappa=0$ の場合も含めて、とりうる全ての (δ , κ) セットで推定される最良モデルの AIC を比較し、これらの中で最も AIC を低くするモデルを最適モデルとして採択し、このときの (α , β , γ , δ , κ) セットを決定する。本研究では、集団間変異として 2 つの変異 (パラメータ γ , κ) を推定したが、変数選択の結果それらが排除される可能性もある。そこで、最後に、最適モデルのパラメータから、どの変数が残り、どのような応答に集団間変異が予測されたか確認した。

さらに、採択された最適モデルを用いて、推定される集団間変異の効果の大きさを環境変化に対する効果の大きさと比較し評価した。本モデルでは、集団間変異は標

高に沿った傾向として表される．そこで，あるリファレンスとなる由来集団と生育環境データを与え，そこから由来集団の標高を一定分上昇させたときの耐凍性獲得タイミングの変化をモデルで予測した．また同時に，由来集団を固定し，同じ標高分上昇させた生育環境データを与えたときの変化も予測した．リファレンスとして与えた生育環境データには，時間別の測定全地点平均の値を用いた．また，上昇させる標高は便宜的に 500 m とし，変化を評価しやすいように大きめに設定した．得られた結果を比較し，同じ標高の変化によってそれぞれどの程度耐凍性獲得タイミングの変化が生じるか調べた．

なお，統計解析は R 2.12.2 を用い，本研究で使った順序ロジスティックモデルはパッケージ rms によった (R Development Core Team, 2011)．

3.4 最適な温度応答モデル

モデル解析から，AIC が最も低いモデルが採択された．最適モデルが推定したパラメータセットを表 1 に示す．変数選択の結果，どの変数も排除されることがなく，想定した 2 つの集団間変異はともにパラメータが推定された．モデル自体が有意なあてはまりを示したことは尤度比検定で確かめられた (Ishizuka et al., 2015)．閾値温度の項にかかる由来集団の標高効果 (κ) は 0.0024 で (表 1)，正の値だった．これは由来集団の標高が高いほど閾値温度も高い傾向があったことを示す．最も標高差の大きい 340 m 集団と 1200 m 集団の間では閾値温度に 2.1°C の違いがあったことが推定された．ま

表 1：最適モデルとして選択された温度モデルのパラメータ．モデルは大きく低温積算量 (R) と閾値温度 (T) の項で構成され，それぞれの項には由来集団の効果として標高が変数として与えられる．最適モデルの探索にあたって， R は最尤推定， T はグリッドサーチで推定した．詳しいモデルの記述は本文参照．転載許可を受け，Ishizuka et al. (2015) より改変して示した．

Table 1: Output best fitted temperature-dependent model. A temperature-dependent model is mainly composed of the sum of chilling requirement (R) and the threshold temperature (T) with the effects of elevation of seed source populations. The best fitted model is determined on the basis of the result of maximum likelihood estimation in R and a grid-search in T (see in manuscript). Modified from Ishizuka et al. (2015) with permission.

変数	推定係数	標準誤差	P 値
α (切片項)	-0.0012	0.0001	<0.0001
$R_{y \geq d}$ (低温積算量の項)			
β_d ($d=0$)	0	—	—
	($d=1$) 8.6566	1.0200	<0.0001
	($d=2$) 7.2612	0.9287	<0.0001
	($d=3$) 5.5177	0.8050	<0.0001
	($d=4$) 4.8055	0.7677	<0.0001
γ (由来集団の効果)	-0.0016	0.0006	0.0051
T (閾値温度の項)			
δ	14.0		
κ (由来集団の効果)	0.0024		

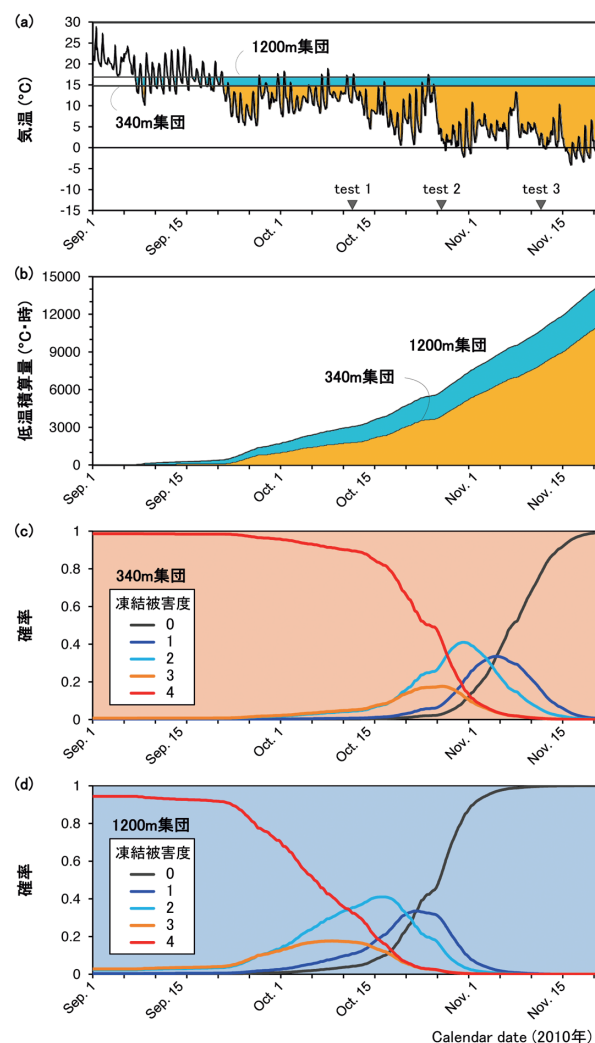


図 4：最適モデルとして採択された温度応答モデルのアウトプット．230 m 試験地の気温と，230 m 試験地に生育する 340 m 集団，1200 m 集団を例としてモデルの出力結果を適用した．(a) それぞれの集団が積算する低温量の視覚化．低温量として積算する値は色塗りの領域で近似でき，気温の時間変動と閾値温度との差分で求められる．340 m 集団が積算する低温量は黄色，1200 m 集団のそれは黄色と水色の和で示した．三角で示した 3 時点で凍結試験用のサンプリングを行った．(b) 時間の推移に伴う，それぞれの集団の低温積算量の増加．凍結被害度確率の推定モデルの変数にはこの低温積算量を用いた．(c) 340 m 集団における凍結被害度別確率の時間変化．(d) 1200 m 集団における凍結被害度別確率の時間変化．転載許可を受け，Ishizuka et al. (2015) より改変して示した．

Figure 4: The application of field data to the best-fit temperature-dependent model and its output. (a) The field air temperature at 230-m planting site, with the estimated threshold temperatures of 340-m and 1200-m populations, as examples. The temperature being accumulated for 340-m population is shown in yellow, and that for 1200-m population is the sum of yellow and blue. The triangles in this graph denote the dates of shoot sampling. (b) Estimated changes in the cumulative sum of chilling of 340-m and 1200-m populations. (c, d) The time series changes in the probabilities of each damage score for population 340-m and 1200-m, respectively. Modified from Ishizuka et al. (2015) with permission.

た、低温積算量の項にかかる由来集団の標高効果 (γ) は -0.0016 で負の値だった。これは、由来集団の標高が高いほど低温要求量が低く、少ない低温積算量で十分な耐凍性を獲得する傾向があったことを示す。これらモデルの出力結果を 230 m 試験地内の 340 m 集団、1200 m 集団を例に図 4 に示した。閾値温度の違い (図 4a) によって実際の気温変動の中で受容する低温シグナルの量が集団間で異なった。そのため、低温積算のパターンにも差異が生じ、1200 m 集団の蓄積量は常に 340 m 集団のそれより多く、時間が経過するほど蓄積量の差が大きくなった (図 4b)。これによって、推定される被害度確率にも集団間差異が生じた。ピークを示す被害度が順に小さくなっていく基本的なパターンは 2 集団で共通していたものの、ピークを示す日時に差異があり、1200 m 集団はより早いタイミングでピークを迎えたことが示された (図 4c, d)。すなわち、高標高集団ほど、高い閾値温度でより多くの低温シグナルを受容し、さらに低い低温要求量によってより少ない低温蓄積で耐凍性を高めるといふ、標高に応じた変異を認めることができた。

これらの変異の効果によって、高標高集団は低標高集団よりも早いタイミングで耐凍性を獲得すると考えられた。このことは、モデルを用いて算出した凍結被害度の時間推移図に明瞭に示される (図 5a)。図 5a の通り、同じ試験地内に生育する個体は由来する標高に沿って耐凍性獲得タイミングが異なっており、被害度が初めて 2 を下回るタイミングを比較した場合、340 m 集団は最も早い耐凍性獲得を示した 1200 m 集団から 13 日遅れることが推定された。標高に沿った同様のパターンは、試験地別の凍結被害度推移図においても認められた (図 5b)。標高の高い試験地ほど気温が低く、低温蓄積量はより多くなるため、それに伴って早い耐凍性獲得があるものと推定された。

温度応答モデルを応用し、集団間変異と環境変化の効果を比較した (図 5c)。リファレンスデータから、試験地環境、由来集団それぞれの標高を 500 m ずつ上昇させ、凍結被害度の時間推移を示した結果、それぞれの予測値を示す 2 つの線は重なるような推移を描いた (図 5c)。被害度が初めて 2 を下回ると予想された日は、生育環境を 500 m 高標高側へシフトさせた場合と由来集団をシフトさせた場合とで 1 日の違いがあるのみだった。すなわち、生育環境が高標高になっても、集団が高標高集団になっても、ともに耐凍性獲得タイミングは早くなり、集団間変異の効果の大きさは環境変化に対する効果の大きさと似ていると解釈された。

3.5 考察

植物のフェノロジーを予測するモデルは複数考案されており、それらのモデルより、駆動因子となる環境シグ

ナルが存在し、フェノロジー調節を司っていることが推察されている (Cannell et al., 1985; Repo et al., 1990; Timmis et al., 1994; Hannerz, 1999; Linkosalo et al., 2006; Hänninen et al., 2007; Aikawa et al., 2010)。ま

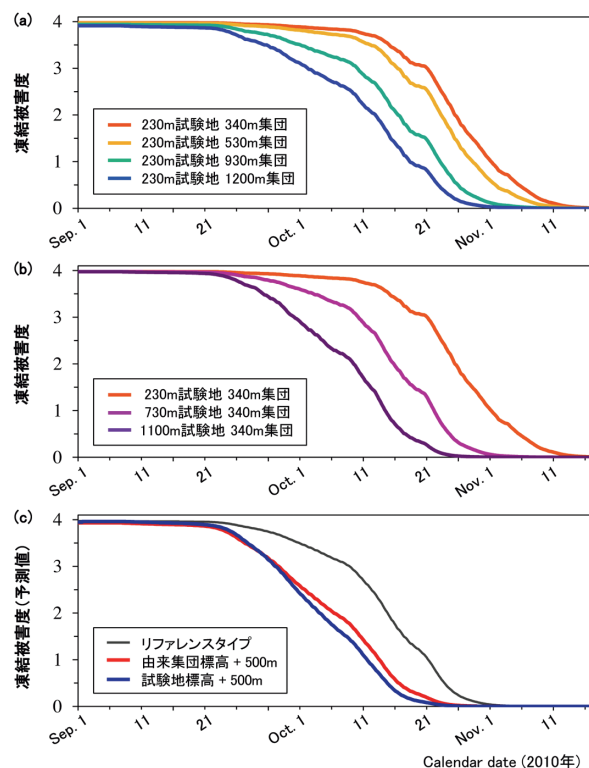


図 5：最適モデルより予測した凍結被害度の時間別推移と、その集団間、試験地間差異。2010 年の実測気温データをもとに -30°C における凍結被害度を予測して示した。(a) 230 m 試験地に植栽された全対象集団 (340 m, 530 m, 930 m, 1200 m 集団) の集団別凍結被害度変化。本種の耐凍性獲得タイミングにおける遺伝的変異を示す。(b) 全植栽試験地 (230 m, 730 m, 1100 m 試験地) における 340 m 集団の試験地別凍結被害度変化。本種の耐凍性獲得タイミングにおける可塑性、すなわち環境の影響を示す。(c) 凍結被害度変化における 500 m の標高変化の影響。2010 年の時間平均気温 (標高別の実測値から算出) を用いて、リファレンスタイプから由来集団の標高を 500 m 増加させた場合と、植栽試験地の標高を 500 m 増加させた場合の凍結被害度の推移をシミュレートした。転載許可を受け、Ishizuka et al. (2015) より改変して示した。

Figure 5: The time series decreases of the freezing damage estimated on the basis of the best-fit model, and its variations among populations and/or planting sites. The field air temperature recorded during autumn 2010 is used to estimate the freezing damage if plants are exposed to -30°C . (a) Estimated changes are shown for all tested populations (230, 530, 930, 1200-m) transplanted at a 230-m site, which refers to the genetic variation. (b) Estimated changes are shown for 230-m population transplanted at all tested sites (230, 730, 1200-m site), which refers to the plasticity as a result of the environmental responses. (c) Estimated changes are drawn using the simulated freezing damage of the reference type and that of pseudo population (500 m upward in elevation of the population), and pseudo planting site (500 m upward in elevation of the site) to compare the magnitude of genetic and environmental effects. Modified from Ishizuka et al. (2015) with permission.

た, 共通圃場試験等により, フェノロジー応答には同一種内でも遺伝的変異があり, 生育する環境に対応していることも指摘される (Rehfeldt, 1989; Morgenstern, 1996; Oleksyn et al., 1998; Aitken and Hannerz, 2001; Howe et al., 2003; Notivol et al., 2007; Mimura and Aitken, 2010). 本研究では, 標高という狭い地理的スケール内における耐凍性獲得タイミングとその遺伝的変異を明らかにするため, 標高間で大きく変わる温度環境を駆動因子として想定し, 温度応答モデル (Timmis et al., 1994; Aikawa et al., 2010) の応用を試みた. 低温要求機構を組み込むことで, 温度に強く規定される春期・秋期フェノロジー (Chapin et al. 1993; Hannerz 1999) の予測に有効とされた温度応答モデルは, トドマツの秋の耐凍性獲得応答に対しても良くあてはまり, 低温シグナルの蓄積をもとに比較的長期間の気温変動で応答を調節する機構が本種にもあったことが示された. さらに, モデルを検討した結果, モデルの構造内に集団間差異が認められることも明らかになり, 本種の耐凍性獲得タイミングが温度依存の応答機構における遺伝的変異によって調節されることが示された.

フェノロジーの遅速が閾値温度に関連した遺伝的変異で説明できることは, 過去の研究でも指摘される (Worrall, 1983). 北方針葉樹の2樹種 (*Abies amabilis*, *A. lasiocarpa*) の開葉フェノロジー (春期の季節的応答) には種間差と種内の集団間差が認められるが, Worrall (1983) は気温への応答に着目し, それぞれの樹種・集団が異なる閾値温度を有することでこれらの応答の差が説明できると考察した. 高い閾値温度は低温シグナルに対する応答感度が高いことを意味し, より早いタイミングでの応答につながると考えられる. しかし, そのような応答調節は, 低温要求量に遺伝的変異を想定することによっても説明できる可能性がある (Hannerz, 1999; Jones et al., 2013). 本研究のモデル解析によって両因子の寄与を定量的に評価したところ, トドマツでは, 閾値温度と低温要求量の両方に遺伝的変異が認められることがわかった. 高い閾値温度による低温蓄積量の素早い増大と, 小さな低温要求量による早い耐凍性獲得が高標高集団で予測され, 2つの温度関連因子の変異によって相乗的なタイミングの調節がなされていたと解釈された.

複数の因子が作用する応答モデルは, 一見複雑で非効率なようだが, たとえば低頻度で生じる猛暑日など変動の大きな環境下においても, 各集団が最適なタイミングで耐凍性獲得を実現するためには有用なメカニズムだと考えられる. したがって, 複数の温度関連因子の共働による制御は, 均衡で頑強な応答調節を説明する適当な仮説となると考えられた. ただし, 馴化機構に他の環境関連因子も関わってくる場合も指摘されることから (Aitken and Hannerz, 2001; Kozłowski and Pallardy,

2002), たとえば気温に加えて日長といった複数の環境シグナルの効果を扱う動的モデル (Leinonen, 1996; Kramer et al., 2000) を用いて, よりよいモデルの検討をしていく必要もあるだろう.

4. まとめ

北方林の常緑樹木が示す秋期の耐凍性獲得は寒冷環境への適応に必須だが, 光合成活性の低下を伴うため, 凍害回避と成長の間にフェノロジカル・トレードオフが生じうる (Chuine, 2010). このトレードオフが存在する場合, 常緑樹木の示す耐凍性獲得は自身の生育環境に最も適したタイミングになっていると予想される. 本稿で紹介した Ishizuka et al. (2015) の研究では, 常緑針葉樹トドマツの標高別植栽試験から材料を得, 時系列の凍結試験を行うことで, 耐凍性獲得タイミングにおける適応的な遺伝的変異を検出した. 温度応答モデルを用いた検討からは, 低温シグナルにตอบสนองし, 低温の蓄積に応じて耐凍性が徐々に高まる, 温度依存の応答調節機構の存在が示された. また, モデル内で遺伝的変異の定量化を試み, 各集団の適応的なタイミングの違いには閾値温度, 低温要求量の両因子による遺伝的制御が関与したことも示唆された. ここで示された例のように, 北方林の常緑樹木の中には, 環境変化に応じた可塑的な応答を可能にする調節機構と適応進化の中で固定された遺伝的な応答調節機構の, 2つの調節機構を見出すことができると推察される. ただし, これら両機構の程度は, フェノロジカル・トレードオフの制約の強さが違う樹種間では異なっていると予想される. それには, 対象種の進化的系統位置や, 分布する標高幅, ないし (標高以外の影響による) 生育環境幅の大きさなどが影響しうるだろう. 環境適応に密接に関わる耐凍性獲得応答の理解を深めることは, 北方林の将来動態の予測にも有用だと考えられる. 今後, 同属他種や分布環境が重複する他属樹種など, 他の北方林樹種を対象にモデルアプローチの適用を広げ, 環境と遺伝の双方の効果の定量的評価ができる, よりよいモデルの検討や, 樹種・環境条件による応答の差異を深く検証していくことが重要だろう.

謝辞

本稿で紹介した著者らの成果は, 東京大学北海道演習林のスタッフ, 北海道大学低温科学研究所のメンバー, ならびに元東京大学教員の倉橋昭夫氏, 元東京大学スタッフの高橋康夫氏の協力により得られました. 図の転載については John Wiley and Sons に許諾をいただきました (© 2014 German Botanical Society and The Royal Botanical Society of the Netherlands, License Number: 3506370969946). 謝意を表します.

引用文献

- Aikawa S., M. J. Kobayashi, A. Satake, K. K. Shimizu and H. Kudoh (2010) Robust control of the seasonal expression of the Arabidopsis FLC gene in a fluctuating environment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **107**, 11632–11637.
- Aitken S. N. and M. Hannerz (2001) Genecology and gene resource management strategies for conifer cold hardiness. In: Bigras F. J., Columbo S. J. (Eds.), *Conifer cold hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 23–53.
- Beuker E., E. Valtonen and T. Repo (1998) Seasonal variation in the frost hardiness of Scots pine and Norway spruce in old provenance experiments in Finland. *For. Ecol. Manage.*, **107**, 87–98.
- Bigras F. J., A. Ryypö, A. Lindström and E. Stättin (2001) Cold acclimation and deacclimation of shoots and roots of conifer seedlings. In: Bigras F. J., Columbo S. J. (Eds.), *Conifer cold hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 57–88.
- Byars, S. G., W. Papst and A. A. Hoffmann (2007) Local adaptation and cline selection in the alpine plant, *Poa hiemata*, along a narrow altitudinal gradient. *Evolution* 61: 2925–2941.
- Cannell M. G. R., M. B. Murray and L. J. Sheppard (1985) Frost avoidance by selection for late budburst in *Picea sitchensis*. *J. Appl. Ecol.*, **22**, 931–941.
- Chen T. H. H., M. Uemura and S. Fujikawa (2006) *Cold hardiness in Plants: Molecular genetics, cell biology and physiology*. CABI Publishers, Oxfordshire, UK: 256 pp.
- Chaine I. (2010) Why does phenology drive species distribution? *Phil. Trans. Roy. Soc. B-Biol. Sci.*, **365**, 3149–3160.
- Chaine I., K. Kramer and H. Hänninen (2003) Plant development models. In: Schwartz M. D. (Ed.), *Phenology: an integrative environmental science*. Kluwer Academic Publisher, London, UK: 217–235.
- Dormling I., A. Gustafsson and D. Von Wettstein (1968) The experimental control of the life cycle in *Picea abies* (L.) Karst. *Silv. Genet.*, **17**, 44–64.
- Eiga S. and A. Sakai (1984) Altitudinal variation in freezing resistance of Saghalien fir (*Abies sachalinensis*). *Can. J. Bot.*, **62**, 156–160.
- 藤川清三 (1996) 凍結に植物細胞はどのように適応するか. *化学と生物*, **34**, 656–666.
- Frank E. and J. Harrell (2001) *Regression modeling strategies: with applications to linear models, logistic regression and survival analysis*. Springer, New York: 568 pp.
- Goto, S., H. Iijima, H. Ogawa and K. Ohya (2011) Outbreeding depression caused by intraspecific hybridization between local and nonlocal genotypes in *Abies sachalinensis*. *Rest. Ecol.* 19: 243–250.
- Greer D. H., L. A. Robinson, A. J. Hall, K. Klages and H. Donnison (2000) Frost hardening of *Pinus radiata* seedlings: effects of temperature on relative growth rate, carbon balance and carbohydrate concentration. *Tree Physiol.*, **20**, 107–114.
- Hannerz M. (1999) Evaluation of temperature models for predicting bud burst in Norway spruce. *Can. J. For. Res.*, **29**, 9–19.
- Hänninen H. and P. Pelkonen (1988) Does the temperature response of rest break of woody plants change during the development? *Can. J. For. Res.*, **18**, 269–271.
- Hänninen H., M. Slaney and S. Linder (2007) Dormancy release of Norway spruce under climatic warming: testing ecophysiological models of bud burst with a whole-tree chamber experiment. *Tree Physiol.*, **27**, 291–300.
- Howe G. T., S. N. Aitken, D. B. Neale, K. D. Jermstad, N. C. Wheeler and T. H. H. Chen (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Can. J. For. Bot.*, **81**, 1247–1266.
- Ishizuka W. and S. Goto (2012) Modeling intraspecific adaptation of *Abies sachalinensis* to local altitude and responses to global warming, based on a 36-year reciprocal transplant experiment. *Evol. Appl.*, **5**, 229–244.
- Ishizuka W., K. Ono, T. Hara and S. Goto (2015) Use of intraspecific variation in thermal responses for estimating an elevational cline in the timing of cold hardening in a sub-boreal conifer. *Plant Biol.*, **17**, 177–185. DOI: 10.1111/plb.12214.
- Johnson J. B. and K. S. Omland (2004) Model selection in ecology and evolution. *Trend. Ecol. Evol.*, **19**, 101–108.
- Jones H. G., R. M. Hills, S. L. Gordon and R. M. Brennan (2013) An approach to the determination of winter chill requirements for different *Ribes* cultivars. *Plant Biol.*, **15**, 18–27.
- Joly R. J., W. T. Adams and S. G. Stafford (1989) Phenological and morphological responses of mesic and dry site sources of coastal Douglas-fir to water deficit. *For. Sci.*, **35**, 987–1005.
- Kohmann K. and O. Johnsen (2007) Effects of early long-night treatment on diameter and height growth, second flush and frost tolerance in two-year-old *Picea abies* container seedlings. *Scand. J. For. Res.*, **22**, 375–383.
- Körner C. (2007) The use of ‘altitude’ in ecological research. *Trend. Ecol. Evol.*, **22**, 569–574.
- Kozłowski T. T. and S. G. Pallardy (2002) Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Bot. Rev.*, **68**, 270–334.
- 倉橋昭夫・濱谷稔夫 (1981) トドマツの垂直分布に伴う変異. *東京大学農学部演習林報告*, **71**, 101–151.
- Kramer K., I. Leinonen and D. Loustau (2000) The importance of phenology for the evaluation of impact of climate change on growth of boreal, temperate and Mediterranean forests ecosystems: an overview. *Int. J. Biometeorol.*, **44**, 67–75.
- Langret O. (1963) Patterns and terms of intraspecific ecological variability. *Nature*, **200**, 347–348.
- Leinonen I. (1996) A simulation model for the annual frost hardiness and freeze damage of Scots pine. *Ann. Bot.*, **78**, 687–693.
- Linkosalo T., R. Häkkinen and H. Hänninen (2006) Models of the spring phenology of boreal and temperate trees: is there something missing? *Tree Physiol.*, **26**, 1165–1172.

- Lindgren K. and J. E. Hallgren (1993) Cold acclimation of *Pinus contorta* and *Pinus sylvestris* assessed by chlorophyll fluorescence. *Tree Physiol.*, **13**, 97-106.
- Mimura M. and S. N. Aitken (2010) Local adaptation at the range peripheries of Sitka spruce. *J. Evol. Biol.*, **23**, 249-258.
- Morgenstern E. (1996) *Geographic variation in forest trees: genetic basis and application of knowledge in silviculture*. University of British Columbia Press, Vancouver, Canada: 209 pp.
- Notivol E., M. R. Garcia-Gil, R. Alia and O. Savolainen (2007) Genetic variation of growth rhythm traits in the limits of a latitudinal cline in Scots pine. *Can. J. For. Res.*, **37**, 540-551.
- Oleksyn J., J. Modrzyński, M. G. Tjoelker, R. Zytowski, P. B. Reich and P. Karolewski (1998) Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects: common garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. *Funct. Ecol.*, **12**, 573-590.
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rehfeldt G. E. (1989) Ecological adaptations in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*) - a synthesis. *For. Ecol. Manage.*, **28**, 203-215.
- Repo T., A. Mäkelä and H. Hänninen (1990) Modelling frost resistance of trees. *Silva Carelica* **15**, 61-74.
- 酒井昭 (2003) 植物の耐寒戦略 寒極の森林から熱帯雨林まで. 北海道大学出版会, 北海道, 226 pages.
- Saho, H., I. Takahashi and A. Kurahashi (1994) Relationship between the elevation of seed collecting sites and the susceptibility of *Abies sachalinensis* to *Scleroderris lagerbergii* in Hokkaido, Japan, Pages 224-247 Meeting of the IUFRO Working Party, Canker and shoot blight of conifers. Vallombrosa, Italy.
- Savolainen O., F. Bokma, R. Garcia-Gil, P. Komulainen and T. Repo (2004) Genetic variation in cessation of growth and frost hardiness and consequences for adaptation of *Pinus sylvestris* to climatic changes. *For. Ecol. Manage.*, **197**, 79-89.
- Savolainen O., T. Pyhäjärvi and T. Knurr (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **38**, 595-619.
- Schmitz J., S. Sung and M. Amasino (2008) Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of *FLC* in winter-annual *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **105**, 5012-5017.
- Skrøppa T. and S. Magnussen (1993) Provenance variation in shoot growth components of Norway spruce. *Silvae Genet.*, **42**, 111-120.
- Timmis R., J. Flewelling and C. Talbert (1994) Frost injury prediction model for Douglas-fir seedlings in the Pacific-northwest. *Tree Physiol.*, **14**, 855-869.
- Van den Droessche R. (1970) Influence of Light intensity and photoperiod on frost-hardiness development in Douglas-fir seedlings. *Can. J. Bot.*, **48**, 2129-2134.
- Vitasse Y., S. Delzon, C. C. Bresson, R. Michalet and A. Kremer (2009) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Can. J. For. Res.*, **39**, 1259-1269.
- Worrall J. (1983) Temperature - bud-burst relationships in amabilis and subalpine fir provenance tests replicated at different elevations. *Silvae Genet.*, **32**, 203-209.