

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 年度 ~2010 年度

課題番号：20570015

研究課題名 (和文)

水生植物の地下部への酸素輸送におけるマスフローおよび拡散の重要性の比較

研究課題名 (英文) Contribution of convective and diffusive gas transport to oxygen balance in belowground parts of aquatic plants.

研究代表者

土谷 岳令 (TACHIYA TAKAYOSHI)

千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20227432

研究成果の概要 (和文)：

水際に生育する大型植物は地下部が酸素欠乏になりやすく、大気から酸素を得る必要がある。酸素を輸送する機構は、単純に濃度差に依存する拡散と、一部の植物でみられる圧力差によるマスフローがある。マスフローをおこなう植物でも、根の酸素要求量は拡散のみで賄えることを明らかにし、マスフローは地下茎伸長等の分布拡大に寄与している可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：

Wetland plants usually suffer from oxygen deficiency in their belowground parts surrounded by reduced soils. They develop one or both of the two mechanisms, i.e., diffusion and convection, to supply oxygen from the air. Even for plants with convective gas transport, oxygen supply only by diffusion affords enough oxygen demand of roots. Oxygen supply by convection must play a role chiefly in runner elongation to enlarge their distribution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：理学

科研費の分科・細目：生物学・生態

キーワード：水生植物、酸素輸送、マスフロー、拡散、生理生態、嫌気耐性

1. 研究開始当初の背景

地下部への酸素輸送機構には拡散とマスフローがある。拡散は大気 - 地下部間の酸素濃度差による酸素輸送、マスフローは体内の空気圧差による空気全体の輸送である。拡散による酸素輸送はマスフローに比べ輸送力が小さいものの大気と地下部では常に酸素濃度差があるため一日中働く。一方、マスフローの加圧は主に大気 - 植物体内の湿度差に依存するので、外気湿度が高くなる夜間な

どではマスフローの働きは低下または停止する。

深刻な酸素不足に陥りやすい深水域に生育する種にとって拡散は重要な酸素供給方法であると考えられる。このことから、深水域などの厳しい嫌気条件に生育する種は常時安定した酸素供給が得られる拡散に大きく依存し、一方穏やかな嫌気条件に生育する種はマスフローに大きく依存すると考えた。具体的には、地下部の酸素要求量、拡散およ

びマスフローによる酸素輸送量を、分布水深の異なる様々な植物種で測定をおこなう計画を立てた。

2. 研究の目的

嫌氣的土壤に生育する水生植物は地下部に酸素を供給する機構を発達させている。その機構はマスフローによるものと拡散によるものと大別できる。前者は大量に酸素を地下部に輸送する上で有効な手段だが、温度や湿度など環境要因に大きく依存し、後者はその逆だと言われている。嫌氣的な状態が続く条件では、常時安定供給可能な拡散によるガス輸送に依存した方が有利と思われる。そこで、本研究ではマスフロー機構獲得の進化生物学的な解明を目標として、まずは、生育地や種特性の異なった植物について、拡散とマスフローのどちらが地下部への酸素輸送に有効な機構なのか、またはこれらの生態学的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)材料

ガマ属の2種、ガマ (*Typha latifolia* L.) とヒメガマ (*Typha angustifolia* L.) を用いた。ガマは茨城県菅生沼から、ヒメガマは千葉県印旛沼から2002年11月に千葉大学構内の実験用水槽に移植され、地下茎による栄養生殖で増えたものを用いた。

拡散フラックスの推定に使用した植物体は上記の植物体を測定の前2カ月前に室内 (室温25°C) の38×57×34 (H) cmのコンテナに移し、シュート長が60cm以上になるまで育成した。根圏を自然環境に近い嫌気状態にするため植物体を20×15×18 (H) cmの泥を満したポットに植え、ポットが完全に水没するようコンテナに深さ20~30cmになるよう水を張った。

ROL、根酸素濃度、根の呼吸速度の測定に使用した個体は上記と同じ千葉大学構内の実験用水槽の植物体を測定の前2カ月前から室内 (室温25度) の38×57×34 (H) cmのコンテナに移し、シュート長が60cm以上になるまで育成した。コンテナ内には水深1.5cm程度水を張り (30 l)、2010年5月に印旛沼で採取した泥 (乾燥重量で200 g) を投入した。水温を鑑賞魚用ヒーター (Tetra社 26°C MiniHeater MH100) で26度に保ち、コンテナ内の水質が均一になるように水中ポンプ (EHEIM社 compact 300) で緩やかに泥水を循環させた (150~300 l h⁻¹)。このとき溶存酸素濃度は1.8~5.4 mg O₂ s⁻¹であった。育成の際の光は窓からの自然光のみとした。

(2) 拡散フラックス DFA および DFB の推定

拡散フラックス DFA は、大気酸素濃度 Sa [mol O₂ mol⁻¹ air]、基部酸素濃度 Si [mol O₂ mol⁻¹ air]、地上部の拡散コンダクタンス D^A

[nmol O₂ s⁻¹]を測定し、次式から求めることができる。

$$DFA = DA (Sa - Si)$$

これらのパラメータを以下の手順で測定した。また、 DFB も同様のパラメータの測定値と次式を用いて求めた。

$$DFB = DA (Sa - Si)$$

①大気酸素濃度 Sa

ガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-8A カラム: Molecular Sieve 5A) を用いて測定した。このとき酸素20.0%標準ガス (ジエールサイエンス株式会社) を基準にスタンダードデータを取った。ガスタイトシリンジ (伊藤製作所 MS-GAN050) で植物体地上部近傍の大気を0.1 mlずつ5本採取し酸素濃度を測定した。

②基部酸素濃度 Si

注射針 (テルモ社 TERUMO NEEDLE 18G×1½) をタイゴンチューブ (サンゴバン社 R-3603) の片端につなげた。他方の端にはセプタムをはめ込み、針から流入した気体が逃げないようにした。この針-チューブの容器は予備実験で酸素透過がほとんどないことを確認してある。この針を植物体基部に刺し、針と植物体との隙間からの気体の漏出入を防ぐため、糊材 (小林製薬 タフグリップ) で覆った。さらに針を刺した部分を寒天に沈めた。

大気が相対湿度0.3~0.4 mol mol⁻¹である乾燥条件、すなわちマスフロー稼働条件で5時間以上静置した。気温は23~25°Cに保った。なお、予備実験で植物体内とチューブ内の酸素濃度が5時間以内に平衡状態になることを確認してある。静置後、チューブのセプタムからガスタイトシリンジの針を刺し込み、チューブ内の気体を0.05ml採取しガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-8A カラム: Molecular Sieve 5A) で酸素濃度を測定した。これを2回行い、平均値をマスフロー稼働時の Si とした。その後、植物体全体をビニールで囲い、ビニール内を加湿して相対湿度1.0 mol mol⁻¹にしマスフローを止めた。この状態で5時間以上静置し、同様にしてマスフロー停止時の Si を測定した。

③地上部拡散コンダクタンス D^A

プラスチック製の密閉容器 (容積46.5ml) を準備し、内部の酸素濃度が測定できるように酸素センサー (日本電池 KDS-25B-5C) を取り付けた。また、容器内の酸素を窒素ガスで追い出すためのコックがガス流入用と流出用の2箇所設け、コックを閉じれば容器は密閉状態になるようにした。 Si 測定のために注射針を刺した箇所を植物体を切断し、地上部側を測定用容器に差し込んだ。さらに内径20mmのビニールホースを植物体地上部にかぶせ、ホース内を加湿器で相対湿度1.0 mol mol⁻¹にし、マスフローを止めた。コックから

窒素ガスを容器内部に送り込み、内部の酸素濃度がほぼ0になるまで酸素を追い出してからコックを閉じた。容器内の酸素濃度の上昇をデータロガー（江藤電気 FLASH DATA LOGGER MODEL5030A）で1秒毎に記録した。測定した酸素濃度上昇速度から D^A を算出した。

(3) 地下茎の実長、相対長

伸長しきった地下茎を採取し、その実長を計測した。また、拡散抵抗を加味した相対長を次の手順で算出した。まず、地下茎の無傷な部分を切り取り、その長さを測った上で拡散コンダクタンス測定容器に差し込んだ。 D^A の測定と同様、容器内の酸素を追い出してから容器内酸素濃度の上昇を測定して地下茎の拡散抵抗を算出した。測定した拡散抵抗の値をその長さ[mm]で割ることで単位長さ当たりの拡散抵抗を求めた。この単位拡散抵抗をもとの地下茎の実長に乗じて相対長[$\text{s nmol}^{-1} \text{O}_2$]とした。

(4) 根酸素漏出速度ROL

アントラキノンによる方法（Matsui and Tsuchiya 2006a）を用いてROLを測定した。

0.1mMアントラキノン-2,6-ジスルホン酸二ナトリウム溶液を作り遮光瓶で保管した。これと50%イソプロピルアルコール溶液を測定直前に1:1で混合し、1M水酸化ナトリウムでpH10.5に調整したものを酸素検出に用いた。

ROL測定装置は以下の部分から成る。純窒素ガスボンベ（G1; 純度99.99995%以上）: キャリアガスとして用いた。チャンバー: 容量4.5lの容器で、窒素ガス流入口、窒素ガス流出口、植物体挿入口の3つの穴が設けてある。窒素ガス流入口にはキャリアガスの流量を調節するためバルブを設置した（KOFLOC社 ベローズニードルバルブMODEL 2450 T）。植物体から放出された酸素はこの容器内に放出され、キャリアガスに乗ってセルに送られる。セル: キャリアガスによって送られてきた酸素をアントラキノン溶液に通し、退色を検出する部位である。植物体試料設置チャンバーから送られてきたガスの流入口と、酸素ガスを捕らえ終わった排気の流出口が設けてある。

ROL測定手順は以下のとおりである。チャンバーの植物体挿入口にはゴム製Oリングが設置され、外径60mmのPVC管が隙間なく入る構造になっている。植物体を外径60mmのPVC管内に固定して、蒸留水で満たされているチャンバーに差し込んだ。植物体の固定にはPVC管の間に隙間ができないよう液状プラスチック（バウンシー社 とめ蔵）を用いた。本研究ではマスフロー停止時のROL測定を目的とした。マスフローは植物体内外の温度差、水蒸気圧差によって葉内を加圧することで引き起こされる（Dacey 1981; Grosse et al 1991）。

そのため、チャンバー外に出ている植物体地上部を内径65mmのPVC管で覆い、このPVC管内部を加湿して相対湿度1.0 mol mol⁻¹にしマスフローを止めた。また、光を遮断することで葉内外の温度差をなくした。セルにはアントラキノン溶液40mlを入れ、外部から光が入らないようアルミホイルで覆った。測定前にはアントラキノン溶液に紫外線ライト（パナソニック ブラックライトブルー蛍光管 FL-4BLB）を照射し赤色にした。光源（Ocean Optics タングステンハロゲン光源LS-1）から伸びる光ファイバを光が石英セルを通過するように設置し、通過した光の強度を分光光度計（Ocean Optics小型ファイバ光学分光器 USB4000）で測定した。チャンバー内と石英セル内にはマグネットスターラーを設置し、液体が均一になるようにした。純窒素ガスの流速は約5 ml s⁻¹に設定した。

(5) 根酸素濃度

ガマ、ヒメガマの根の呼吸速度はさらされている溶存酸素濃度に依存する（Matsui and Tsuchiya 2006b）。すなわち本研究では自然に近い溶存酸素濃度条件で呼吸速度を測定する必要がある。自然条件では水生植物の根は嫌気的な土壌に囲まれ、酸素が速やかに消費される状態になっている。そこで、酸素が速やかに消費される環境を再現するため、ROL測定装置を利用した。ROL測定装置のチャンバー内ではキャリアガスによって酸素が速やかに排出され、自然に近い条件になっている。各植物体から無作為に根を4本選出した。選出した根を中央で切断し、酸素透過性の低いタイゴンチューブ（サンゴバン社 R-3603）の端につないだ。この時チューブと根の隙間を耐水性ボンドで埋めた。チューブの他端はセプタムで栓をしてある。これをROL測定時と同様にPVC管に固定しROL測定装置のチャンバーに差し込んだ。マスフロー停止時の根中の酸素濃度を求める必要があるため、植物体地上部にPVC管を被せ管内を加湿した。この状態で12時間以上静置した。チューブ内の酸素濃度は5時間以内で平衡に達することを確認してある。静置後、外部の酸素が漏入しないよう直ちにチューブの先をクリップで挟み、水を張ったコンテナ内に一時的に保管した。チューブのセプタムからガスタイトシリンジの針を差し込み、中の気体を0.1ml採取してガスクロマトグラフィーで酸素濃度を測定した。1本のチューブにつき3本採取、計測した。1個体につき4本のチューブ、各3サンプルで合計12サンプルから得た酸素濃度データを平均してその個体の根中の酸素濃度とした。

(6) 地下部呼吸速度

ROLを測定し終わった個体を基部で切断し、地下部のみを呼吸速度測定用の密閉容器に入れた。地上部は80°Cで2日間乾燥させ地上部乾燥重量を測定した。呼吸速度測定用の容器は

内部の溶存酸素濃度を測定するため、蓋に溶存酸素計 (Hach社 HQ30 d) のセンサーの差し込み口が設けてある。溶存酸素計の差し込み口はシリコンパテで隙間が無いよう覆い、さらに液状プラスチックで覆った。このとき、容器内の水が低溶存酸素条件 (約 0.1 mg l^{-1}) でも外部からの酸素漏入がないことを予備実験で確かめてある。容器内の水が滞留しないようスターラーで攪拌した。外部からの酸素漏入を防ぎ、スターラーによる水温上昇を防ぐため、容器全体を 25°C の恒温槽に沈めた。溶存酸素濃度の変化を測定した後、植物体地下部を 80°C で2日間乾燥させ地下部乾燥重量 (bgdw) を測定した。容器内の溶存酸素濃度が測定した根中の酸素濃度の値を示した前後10分間の溶存酸素減少速度から地下部呼吸速度 [$\text{nmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ bgdw s}^{-1}$] を求めた。

4. 研究成果

(1) 拡散依存度は水深勾配に沿った帯状分布を説明するには不適

地下部乾燥重量当たりの拡散速度はガマで 4.23 ± 1.58 (s.d., n=4)、ヒメガマで $5.72 \pm 1.98 \text{ nmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ bgdw s}^{-1}$ (n=5) と、ヒメガマの方が有意に高い値 ($P=0.03$) になった。また、地下部乾燥重量当たりの全酸素供給速度はガマで 5.00 ± 2.11 、ヒメガマで $8.23 \pm 2.58 \text{ nmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ bgdw s}^{-1}$ とこれもまたヒメガマの方が有意に高い値 ($P=0.01$) になった。全酸素供給速度と拡散速度の差から算出したマスフロー由来の酸素供給速度はガマで 0.77 ± 0.55 、ヒメガマで $2.51 \pm 0.81 \text{ nmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ bgdw s}^{-1}$ となり、ヒメガマの方が有意に高い値になった ($P=0.008$)。地上部乾燥重量当たりの拡散速度はガマで 3.90 ± 1.46 、ヒメガマで $3.51 \pm 1.21 \text{ nmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ bgdw s}^{-1}$ となり、種間に有意な差はみられなかった ($P=0.67$)。また、地上部乾燥重量当たりの全酸素供給速度はガマで 4.62 ± 1.95 、ヒメガマで $5.04 \pm 1.58 \text{ nmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ bgdw s}^{-1}$ とこれもまた種間に有意な差はみられなかった ($P=0.73$)。

拡散依存性を評価するために地下部乾燥重量当たりの拡散由来の酸素供給速度と全酸素供給速度を測定し、その比を拡散依存度とした。拡散依存度はガマで 0.86 ± 0.04 、ヒメガマで 0.69 ± 0.05 となった。(図 6) より深水域に生育するヒメガマの方が低い値となり予想に反した。

このように拡散依存度は、深水域に生育するヒメガマの方が浅水域に生育するガマよりも小さかった。これは、浅水域のヨシ、中間水域のミクリ、深水域のマコモの拡散依存度はそれぞれ 0.15, 0.59, 1 と深水域に生育する種ほど拡散依存度が大きいという傾向があったことと矛盾するように思える。つまり、水深勾配に沿った分布の違いを拡散依存度で評価すべきではないことがわかった。

この原因は拡散への依存性を「全酸素供給速度に対する拡散由来の酸素供給速度」という相対値で評価しようとしたことにある。すなわち、拡散に大きく依存する場合、マスフローによる酸素供給速度が小さくなると仮定していたこと、つまり拡散もマスフローもともに大きな値をとる可能性を無視していたことである。これはマスフローの方が拡散よりも給気能力が高く (Becket et al 1988; Armstrong and Armstrong 1991)、深刻な嫌気条件にさらされる危険を回避できる環境に植物がおかれている場合ではなるべくマスフローに依存した方が有益だと考えたことに原因がある。

マスフローは外気が高湿度になると働きが低下、停止するという特性から、より深刻な嫌気状態の深水域に生育する種はマスフローに依存しないと思いがちであるが、本研究ではその可能性が小さいことを示すことができた。つまり、地下部乾燥重量当たりのマスフロー由来の酸素供給速度は、深水域に生育するヒメガマの方が浅水域に生育するガマよりも大きい値を示した。同時に浅水域に生育し、極端な嫌気状態にさらされる心配のない種が、マスフローを使い多量の酸素を地下に送り込んでいるというわけではないことがわかった。

(2) マスフローによる酸素輸送は地下茎伸長に使われている可能性

ヒメガマでは、マスフローを停止させると地下茎伸長が抑制されることが報告されている (White and Ganf 1998)。本研究ではガマとヒメガマの2種で地下茎の長さがマスフロー能力に対応していることを示した。マスフローによって稼がれた地下部への酸素フラックスが地下茎伸長に利用されているという可能性を支持する結果が得られた。

(3) 拡散による酸素供給は地下部の維持に必要な酸素消費を賄うのに十分

根中の酸素濃度は個体間のばらつきが少なく、平均値はガマで 1.1、ヒメガマで 1.6 mg l^{-1} となった。根酸素濃度の結果を用いて各個体の地下部呼吸速度を測定したところ、ガマ、ヒメガマともに個体間のばらつきが大きく、平均値はガマの方が大きい値となった。地下部乾燥重量当たりの ROL は個体間のばらつきが少なく、平均値はガマで 0.308、ヒメガマの方が $0.363 \text{ nmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ bgdw s}^{-1}$ となり有意に高かった。

呼吸速度と ROL の和である地下部酸素需要は、地下部乾燥重量当たりの拡散速度と同じ傾向がみられた(図は省略)。つまり、地下部乾燥重量当たりの拡散速度と地下部酸素需要の比をとると、 $0.96 \pm 0.06\%$ (s.d., n=8) となり、10%以内の誤差で一致していた。

本研究のガマ、ヒメガマ両種において地下部酸素需要と地下部乾燥重量あたりの拡散

速度はほぼ等しい値となり、地下部へ拡散で供給される酸素で十分に呼吸とROLが賄われていることがわかった。地下部呼吸速度のKm値はガマで0.43、ヒメガマで0.40 mg l⁻¹ (Matsui and Tsuchiya 2006) となり、本研究で測定された根酸素濃度 1.1~1.6 mg O₂ l⁻¹ では呼吸が十分に機能することが推察される。このことから、ヒメガマのように比較的マスフローのはたらきが大きな種でも、マスフローは地下部酸素需要の充足に必須なのではなく、拡散のみで地下部酸素需要を維持できることがわかった。すなわち拡散による酸素供給の意義は地下部の維持にあると考えられる。

ROL、根酸素濃度が同種個体間でほぼ一定で、根の呼吸速度は様々な値を示した結果から次のように推察される。ガマやヒメガマの根の呼吸速度は、周りの溶存酸素濃度が低下するに従って小さくなる (Matsui and Tsuchiya 2006)。供給される酸素フラックスは地上部の大きさ(乾燥重量)で決まると仮定すると、地上部/地下部の乾燥重量比が大きければ地下部乾燥重量当りに供給される酸素フラックスが大きくなり、根の呼吸速度が増加する。これは地上部が大きいほど水や栄養塩の供給のため根の呼吸を盛んにする必要があり、理にかなっている。逆に地上部/地下部の乾燥重量比が小さければ地下部に供給される酸素フラックスが小さくなり、根の呼吸速度が減少する。これらの結果、根酸素濃度は一定の値に落ち着くと考えられる。根の外側の酸素濃度はほぼ0であるから、ROLは根中の酸素濃度に比例する。根酸素濃度とROLは同種個体間でほぼ一定であったことから、根表面の酸素透過コンダクタンスも同種個体間でほぼ一定であると思われる。すなわち、上記のように根酸素濃度が一定になることに伴い、ROLも一定の値に落ち着くと考えられる。呼吸速度が変化することで地下部酸素需要が拡散による酸素供給フラックスとほぼ等しく調節されていると考えることができる。

これまでマスフローと拡散という酸素供給方法は、水深勾配に沿った帯状分布に関係あると考えられがちだった。マスフローをおこなう種は拡散のみをおこなう種よりも深い水深に生育できるとも考えられてきた (Brix et al 1992)。また、マスフローはヒメガマにおいて地下茎の伸長に大きく寄与しているとも言われてきた (White and Ganf 1998)。このように拡散とマスフローの意義には様々な説があった。本研究の成果は、マスフローの意義が地下茎の伸長にあることの裏付けを増したこと、拡散のみで地下部酸素需要を賄えることを確認したことにある。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Inoue MT, Tsuchiya T Depth distribution of *Typha orientalis* Presl in an artificial Pond. Plant Species Biology 24:47-52 (2009) 査読あり

[学会発表] (計0件)

[その他] ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 岳令 (TSUCHIYA TAKAYOSHI)
千葉大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：20227432

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし