

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770027

研究課題名(和文)植物の栄養・繁殖成長が個葉の枯死に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of whole-plant growth on leaf shedding

研究代表者

及川 真平(Oikawa, Shimpei)

茨城大学・理学部・助教

研究者番号：90400308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：植物の個体全体の成長が葉の枯死に与える影響を解析した。1)オオオナモミを用いて、支持器官の呼吸速度が高い個体ほど葉寿命が長いことを明らかにした。これは「支持器官の呼吸コストが高い植物ほど葉寿命が短い」という従来の仮説を支持しない。2)ダイズを用いて、葉の枯死の制御には群落内の光環境、窒素獲得、若い組織の窒素要求が関与していることを明らかにした。これらの相対的重要性は植物の生育段階と大気CO₂濃度によって変化した。3)仮説「個体全体の炭素獲得が最大となるタイミングで葉が枯れる」の検証を行った。ダイズとイネでは、窒素の可給性に関わらず、最適タイミングよりも遅く葉が枯れていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The effects of whole-plant growth on leaf dynamics were studied. First, the growth, reproduction and leaf dynamics were investigated in an annual herb *Xanthium canadense* grown in a low- and high density. The results did not support the hypothesis that plants having higher respiration cost at whole-plant level would have leaves with shorter leaf lifespan. Second, in nodulating soybean and its non-nodulating isogenic line, regulation of leaf loss involved various factors, such as light availability within the canopy, N acquisition and N demands in new organs. These effects varied among the growth stages and CO₂ levels. Third, I examined if a leaf was shed at the optimal timing that increases the whole-plant photosynthesis in stands of rice grown with a different nitrogen and CO₂ treatments, and in soybean grown under different tropospheric ozone concentrations. In all cases, the shedding of older leaves occurred later than the optimal time.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生態・環境

キーワード：葉寿命 光合成 窒素 最適モデル

1. 研究開始当初の背景

葉の最も主要な役割は、光合成をして炭素を獲得することである。葉の生涯の炭素獲得量は、その葉が光合成で同化した炭素量から、葉の構築と維持のために呼吸で消費した炭素量を差し引いたものと定義され、これが植物に対する1枚の葉(個葉)の貢献となる。葉の光合成速度は展開直後に最も高く、その後、他の葉による被陰や生理的な劣化により低下する。近年まで、葉が枯死するのは光合成と呼吸が等しくなったとき、すなわち1日あたりの葉の光合成速度がゼロに達するまで光合成が低下したときであると考えられてきた。光合成できなくなるまで葉が生きた場合に、その葉の生涯の炭素獲得量は最大となるからである(Chabot & Hicks 1982 他)。実際にいくつかの植物では枯死直前の葉の光合成速度はゼロであった(Kuppers 1984, Ackerly 1999)。しかし多くの研究が、1日あたりの光合成速度がゼロに達する前に枯れることを報告した(Kitajima *et al.* 2002, Mediavilla & Escudero 2003 他)。まだ光合成できる葉が枯れるのはなぜかが疑問とされた。

応募者は、圃場で育成したキク科オオナモミにおいて、富栄養下では枯死直前の葉の1日あたりの光合成速度はほぼゼロであるが、貧栄養下ではゼロよりも大きいことを示した(Oikawa *et al.* 2006)。これは、古い葉が持つ窒素を若い葉に転流したほうが植物全体の光合成速度が増加するためであることを、数理モデルを用いて明らかにした(Oikawa *et al.* 2008)。しかし、ツツジ科のロドデンドロン・フェルギネウムでは、土壤中の窒素の多寡に関わらず、個葉の枯死が個体全体の光合成速度の増加にはつなげていなかった(Marty *et al.* 2010)。しかし、この不一致が生じたメカニズムは明らかにされていない。

一方、光合成できる葉が枯れる理由として、個体全体の呼吸コストの観点から提唱された仮説があった。葉はその光合成により、自身の呼吸だけでなく茎や根の呼吸による炭素消失をまかなう。そのため、葉は個体全体の呼吸による炭素消失を償却できなくなったときに枯れるはずであり、葉の呼吸のみを考慮したときと比べて、より早く光合成は呼吸と等しくなり葉は枯れると考えられる

(Givnish 2002)。この仮説は、上記の個体全体の光合成に関する説明と必ずしも対立するものではない。本研究は、これらを同時に比較、検証し、葉の枯死の機構について統一的な理解を目指すこととした。

また以上の研究はいずれも栄養成長期に行われたものであり、繁殖成長が葉の枯死にどのような影響を与えるのかは判っていない。多くの植物で葉の枯死と繁殖成長が同期的に起こることが観察されており(Sinclair & de Wit 1975 他)、枯れゆく葉と個体内の繁殖成長とが生理的に関係していることを予見させるが、現在までその直接的な証拠はない。

2. 研究の目的

古い葉が持つ窒素を若い葉に転流した時、もし若い葉が実現する光合成速度が高いのであれば、古い葉がまだ正の炭素獲得を維持していてもその葉を枯らしたほうが個体全体の炭素獲得は増加する(Franklin & Agren 2003)。この条件は、若い葉の光合成速度/葉窒素含量比(窒素利用効率)に対する枯死直前の葉の窒素利用効率の割合が、枯死直前の葉が持つ窒素のうち若葉に転流されるものの割合(窒素回収効率)より低くなるときに満たされる(Escudero & Mediavilla 2003)。本研究は、個葉の枯死と個体全体の光合成の関係に対して(1)繁殖成長、(2)葉以外の器官の呼吸が与える影響を解析し、葉の枯死がどのように決まるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 茎や根といった支持器官と葉寿命の関係を明らかにするため、キク科の一年生草本オオナモミ(*Xanthium canadense*)を用いて実験を行った。この植物は直立型の生育を示し、個葉サイズが大きく数がそれほど多くないこと、そして多くの葉特性データが集積している植物であり、生育条件によってバイオマス分配が変わることが知られる(Oikawa *et al.* 2005, 2006, 2008, Kinugasa *et al.* 2003, 2005 他多数)ことから、本研究に利用可能であると考えた。2010年12月に宮城県川崎町釜房湖畔で採取した種子を、2011年6月19日に水を入れたペトリディッシュに浸し発芽させた。6月23日、発芽した実生を、川砂をつめた1.5Lワグネルポットに移植し

た。個体密度の異なる群落を2つ作成した(高密度区 59.2 個体/m²、低密度区 6.3 個体/m²)。この後、約10日毎に施肥(2.98 mg N/pot/day)と毎日散水を行った。ポットのローテーションを適宜行った。

高密度区、低密度区ともに7個体を選び、全ての葉にビニール製のラベルを付け、葉位を同定した。葉位の付け方は以下の通りである:主茎に一番初めに作られた葉を「葉位1」、次に作られた葉を「葉位2」、その後を「葉位3」「葉位4」・・・とした。主茎の葉位1の葉腋に作られた分枝上において一番始めに作られた葉を「葉位1-1」、その分枝に二番目に作られた葉を「葉位1-2」、主茎の葉位2の葉腋に作られた分枝上の葉を「葉位2-1」「葉位2-2」・・・とした。全ての葉の長さ、主茎の長さ、基部直径を測定した。開花後は、個体あたりの種子数を数えた。以上の追跡調査を、実生移植後、種子が成熟した11月まで、約2週間おきに行った(計9回)。

高密度区、低密度区からそれぞれ4個体を選び、全ての葉の長さ、主茎の長さ、基部直径を測定した。葉、茎・枝、根に切り分け、全ての葉をスキャナーで撮影した。スキャンした葉の面積はImage J (NIH, USA)を用いて測定した。各器官を乾燥しないように霧を吹いたビニール袋に入れ、暗中に置いたあと、暗呼吸速度を測定した。呼吸速度の測定は、赤外線ガス分析機LI-6400 (Li-Cor, Nebraska, USA)との円柱型のアクリル製チャンバー(内径11.8cm、高さ8.2cm)を用いて行った。チャンバー温度は測定時の直前10日間の日平均気温を用いた(7月28、8月30、9月26、10月22、11月19)。呼吸速度の測定後、葉と茎・枝を葉位(メタマー)に切り分けた。各サンプルを70のオーブンで48時間以上乾燥させた。

サンプリングで得た器官(葉、茎・枝、根、種子)の乾燥重量(バイオマス)を測定した。電動ミルを用いてサンプルをパウダー状に粉碎し、炭素・窒素含量を測定した。測定には炭素・窒素分析器NC-22F (Sumigraph, Sumika-Bunseki, Osaka, Japan)を用いた。

個葉の寿命、Leaf Area Duration(葉面積と生育期間の積)をHirose (2011)とHirose & Oikawa (2012)に従い計算した。

安定同位体を用いて、枯れゆく葉と繁殖器官との生理的な連結を直接検証した。繁殖開

始前に¹⁵Nでラベルした尿素(H₂¹⁵N CO¹⁵N H₂)を展開が完了した葉の表面に塗布し、その後数日間にわたり¹⁵Nの行方を追跡した。葉表面から吸収された窒素化合物は、すみやかにアミノ酸に同化され、植物の各部に輸送されることが確かめられている(Karasuyama *et al.* 1985 他)。窒素化合物の塗布は、その溶液の濃度や周囲の環境により葉に致命的なダメージを与えることがある(Finney *et al.* 1957 他)ので、適切な実験方法を確立するために数段階の濃度で試験を行う。同位体比はSchmidt & Scrimgeour (2001)に従って解析した。

以上のデータを用いて、茎・根の呼吸による炭素消費を償却できなくなったときに葉は枯れるという仮説の検証を行った。

(2) 繁殖、葉の相互被陰、窒素固定そして大気中二酸化炭素濃度が葉の枯死に与える影響を解析した。実験は東北農業研究センターのグラディオトロンシステムを用いて行った。このシステムは、隣接する2つのグリーンハウスチャンバーからなり、それぞれのサイズは幅6m、長さ30m、高さが3mである。片方のチャンバーは通常大気CO₂濃度に制御され、もう片方のチャンバーは通常大気CO₂濃度+200 μmol mol⁻¹となるよう制御した。根粒を着生する通常のダイズ品種(Glycine max cv. Enrei)と、根粒を着生しないその同質遺伝子系統(En1282)をポット育成し、ポットを敷き詰め群落を作成した。現存葉数は、葉の生産と枯死のバランスとして解析した。つまり、現存葉数が多いのは、生産速度が高いから、もしくは損失速度が低いからだと考えられる。各処理区から4個体ずつランダムに選び、葉の成長を追跡調査した。10日おきに個体内の全ての葉の長さ、幅を測定し、それらと葉面積のアロメトリー関係から葉面積を推定した。10日おきに追跡個体の近隣の個体において、リーフディスク(78 mm²)を採取し、葉面積あたりの葉重と、葉窒素濃度を測定した。これらの値を追跡個体に適用し、追跡個体の葉重と葉窒素含量を推定した。繁殖期には、追跡個体の全ての鞘の長さを10日おきに測定した。鞘の長さ、乾燥重量、窒素含量のアロメトリー式を用いて、追跡個体の鞘重と鞘窒素含量を推定した。

(3) 個葉の枯死が個体全体の光合成速度を増加させるという仮説を、複数の種・環境条件下で集積されたデータ(及川、未発表)に Escudero & Mediavilla (2003) のモデルを適用して検証した。高濃度二酸化炭素、高濃度オゾン条件下では、葉の枯死が早まることが観察されている(及川、未発表)。枯死の早期化が個体全体の光合成の増加と関与しているのかを検証した。

3水準の窒素施肥と2水準の大気CO₂濃度の下で育成したイネ群落と、2水準の大気CO₂濃度の下で育成した2系統のダイズ群落(根粒着生系統と非着生系統)において、群落光合成モデル(Monsi & Saeki 1953, Hirose & Werber 1987)を応用して個葉ごとの1日の光合成速度を推定した(Oikawa et al. 2006の方法に従った)。光合成を測定した後、それらの葉を切り取り、実験室に持ち帰り、乾燥・粉碎後、炭素・窒素分析器NC-22F(Sumigraph, Sumika-Bunseki, Osaka, Japan)を用いて葉窒素含量を測定した。また、随時枯葉を採取し、その窒素含量を測定した。最適な葉の枯死タイミングは、若い葉の窒素利用効率(日光合成速度/葉窒素含量)あたりの古い葉の窒素利用効率が、窒素回収効率((古い葉の窒素含量 - 枯葉の窒素含量)/古い葉の窒素含量)と等しくなったときと定義した(Escudero & Mediavilla 2003, Oikawa et al. 2008)。

4. 研究成果

(1) 高密度個体よりも低密度個体で植物高が低く、分枝数が多く、生産葉数が多く、個葉サイズが小さかった。高密度個体に比べ、低密度個体では節間がつまっている。個体の総重量(乾燥重量)は8月から9月に大きく増加し、10月にほぼ飽和した。葉の重量は7月から9月上旬にかけて増加し、その後減少した。葉の重量は高密度個体よりも低密度個体で大きかった。葉の重量の低下は、種子重量の増加と同調しており、葉から種子への窒素、炭素の分配が示唆される。茎の重量は、低密度個体よりも高密度個体で大きかった。しかし、茎長の違いほど重量の違いは大きくない。これは、低密度個体のほうが茎の直径が大きく、材が密なためであった。個体あたりの支持器官重量(茎、枝、根の乾燥重量の総計として評価)は、予測に反して個体密度

によって大きく異ならなかった。高密度個体のほうが長い主茎を作ったが、低密度個体は大きな根系を形成したためであった。

低密度個体は、高密度個体に比べて、生産葉数、枯死葉数共に約2倍多かった。主茎の葉数は個体密度の影響を受けておらず、個体の生産葉数と枯死葉数の個体密度による違いは、分枝上に作られた葉の数の違いによっていた。Hirose & Oikawa (2012)に従い葉寿命を算出すると、高密度個体(41.3日)よりも低密度個体(42.8日)で長かった。低密度個体が生育期間中に生産した葉面積の総量は、その生産葉数の多さにも関わらず、高密度個体の生産葉面積よりも少なかった。これは、低密度個体の葉は、高密度個体の葉に比べてサイズ(個葉サイズ)が小さかったためである。葉面積の枯死は、高密度個体に比べて低密度個体でやや遅く進行した。しかし、現存葉面積は常に低密度個体よりも高密度個体で高かった。これらの葉面積動態のパターンは、主茎上のそれを大きく反映した。分枝上の葉は個葉サイズが小さく、個体全体の葉面積に及ぼす影響は小さかった。Hirose & Oikawa (2012)に従いLeaf area duration(葉面積の寿命に相当する)を算出すると、高密度個体(40.5日)よりも低密度個体(42.5日)で長く、個葉の寿命と同様の傾向が見られた。

測定温度(各月の日平均気温)下における単位重量あたりの呼吸速度(SRR, specific respiration rate)は、いずれの器官でも発生開始後に高く、器官の発育とともに急激に低下し、その後低下が緩やかとなった。この低下は低密度個体よりも高密度個体で早く進行する傾向が見られた。高密度個体の葉でのみ、10月にSRRが上昇した。過去にもオオオナモミにおいてSRRが老化期に増加することが報告されている(Kinugasa et al. 2005)。個体の乾燥重量とSRRの積として、個体あたりの呼吸速度を算出した。高密度個体では、個体の齢とともに呼吸速度がゆるやかに増加した。低密度個体では、呼吸速度は8月に急増し、その後低下した。8月に呼吸速度が高かったのは、SRRの低下が高密度個体に比べて緩やかだったのと、乾燥重量がやや高かったためである。個体あたりの支持器官の呼吸速度(茎、枝、根の呼吸速度の総計として評価)は、高密度個体よりも低密度個体で高

かった。

実験開始時には、支持器官バイオマスの大きい個体ほど、これらの器官の呼吸速度が高いことを期待した。そして、もし支持器官の呼吸速度が葉の生育期間を決定するならば、支持器官の重量が大きい個体ほど葉寿命、Leaf area duration、窒素の平均滞在時間、Nitrogen duration が短いことを予測した。支持器官の重量は高密度処理と低密度処理とでほぼ同じであったが、支持器官(茎、枝、根)の単位重量あたりの呼吸速度(SRR)は低密度個体で高かったため、個体あたりの呼吸速度は高密度個体よりも低密度個体よりも高かった。しかし、予測と異なり、個葉の平均寿命は高密度個体よりも低密度個体で長かった。

本研究から、支持器官の呼吸速度が高い個体ほど葉寿命が長いということが示された。これは、「支持器官の呼吸コストが高い植物ほど葉の炭素収支がより早くゼロに達するため、葉寿命が短い」という仮説をサポートしない。本実験では、高密度個体は葉の受光強度が齢とともに急激に低下したのに対し、低密度個体ではそうした受光強度の低下は遅かった。そのためより遅くまで光合成が可能であり、葉寿命が長かったのかもしれない。

(2)根粒を着生する通常のダイズ品種では、CO₂ 上昇によって葉面積生産が増加した。一方、根粒を着生しない同質遺伝子系統ダイズでは、CO₂ 上昇による葉面積生産の増加は、根粒着生ダイズに比べて小さかった。CO₂ 上昇によって、根粒着生ダイズの葉面積の枯死が促進されたが、根粒非着生ダイズでは変化しなかった。その結果、両タイプとも高 CO₂ 濃度下で似たような LAI (葉面積指数、単位土地面積あたりの総葉面積量) 促進を示した。根粒着生ダイズにおける葉の枯死の促進は、茎の先端に作られる新しい葉が、茎のより下方にある古い葉を被陰することによって起こっていた。根粒着生ダイズは生育期間を通して窒素を獲得していたが、非着生ダイズでは、開花期までに土壤中の窒素を吸収しつくしたため、生殖期には窒素獲得が見られなかった。古い組織から若い組織への窒素の再転流と、それにより生じる葉の枯死は、根粒着生ダイズに比べて非着生ダイズで早かった。

ダイズの LAI 制御には様々な要因が関与し

ていることが明らかとなった。その要因として、群落内の光環境、窒素獲得、そして若い組織における窒素要求が挙げられた。これらのうちどれが重要かは、植物の生育段階と大気 CO₂ 濃度によって変化していることが明らかとなった。

(3) ダイズ群落において、群落最下層にある最も加齢の進んだ葉の1日の光合成速度はゼロから有意に外れていなかった。Escudero & Mediavilla (2003) の最適な葉の枯死タイミングの定義から、これは古葉からの窒素回収率がゼロで無い限り、葉の枯死は最適タイミングよりも遅れたことを意味する。実際、窒素回収率はゼロより高かった。つまり、最適なタイミングよりも遅く葉は枯れていた。この結果は、根粒着生の有無に関わらず同様であった。

3水準の窒素施肥と2水準の大気 CO₂ 濃度の下で育成したイネ群落でも、基本的にダイズと同様の結果が得られた。

これらの結果は、私たちが野生種(キク科の一年草オオナモミ)で得た結果とは一致しない。すなわち、オオナモミでは、窒素の可給性が低いときには葉は最適タイミングで枯れ、窒素の可給性が高いときには最適タイミングよりも遅れて葉が枯れた。ダイズとイネでは、窒素の可給性に関わらず、最適タイミングよりも遅く葉が枯れていることが明らかとなった。なぜ種間で結果が異なったのかは現時点では不明である。

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9件)

Shimpei Oikawa, Masumi Okada, Kouki Hikosaka (2013) Effects of elevated CO₂ on leaf area dynamics in nodulating and non-nodulating soybean stands. *Plant and Soil* 373: 627-639 (査読有り)

Zhu Chunwu, Weigo Chen, Hidemitsu Sakai, Shimpei Oikawa, Rebecca C Laza, Yasuhiro Usui, Toshihiro Hasegawa (2013) Effects of elevated [CO₂] on stem and root lodging among rice cultivars. *Chinese Science Bulletin* 58: 1787-1794 (査読有り)

及川真平・長田典之・宮沢良行・宮田

理恵・Onno Muller (2013) 葉寿命研究の歴史と近況. 日本生態学会誌 63: 11-17 (査読有り)

長田典之・及川真平・宮田理恵・神山千穂 他4名2番目(2013)環境条件に応じた葉寿命の種内変異のパターン: 一般的傾向と機能型間の差異. 日本生態学会誌 63: 19-36 (査読有り)

及川真平・長田典之(2013)葉の枯死と個体の炭素収支. 日本生態学会誌 63: 59-67 (査読有り)

長田典之・及川真平・Onno Muller・宮田理恵(2013)葉寿命研究のこれから. 日本生態学会誌 63: 81-83 (査読有り)

Tadaki Hirose, Shimpei Oikawa (2012) Mean residence time: leaf number, area, dry mass, and nitrogen in canopy photosynthesis. *Oecologia*, 169: 927-937 (査読有り)

Toshihiko Kinugasa, Takashi Sato, Shimpei Oikawa, Tadaki Hirose (2011) Demand and supply of N in seed production of soybean (*Glycine max*) at different N fertilization levels after flowering. *Journal of Plant Research* 125: 275-281 (査読有り)

Kouki Hikosaka, Shimpei Oikawa, Toshihiko Kinugasa, Yusuke Onoda, Tadaki Hirose (2011) Effects of elevated CO₂ concentration on seed production in C₃ annual plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 1523-1530 (査読有り)

〔学会発表〕(計8件)

椎名愛里、及川真平、長谷川利拡「CO₂上昇と窒素施肥がイネ群落の LAI に与える影響」第 61 回日本生態学会、2014.3.16、広島

及川真平、Elizabeth A Ainsworth「対流圏オゾン濃度勾配(FACE)に沿ったダイズ群落の葉面積、窒素、葉群光合成速度の変化」第 60 回日本生態学会、2013.3.7、静岡

神山千穂、及川真平、上田実希、彦坂幸毅「8年間の温暖化実験による湿原植物の群集構造変化」第 60 回日本生態学会、2013.3.7、静岡

彦坂幸毅、Niels P.R. Anten、及川真平、神山千穂、Almaz Borjigidai、酒井英光、長谷川利拡、廣瀬忠樹「草本植物葉群内におけ

る葉間窒素分配のメタ解析」第 60 回日本生態学会、2013.3.7、静岡

Shimpei Oikawa, Hiromi Ehara, Mika Koyama, Tadaki Hirose, Kouki Hikosaka, Hidemitsu Sakai, Toshihiro Hasegawa「Dynamics of leaf area and nitrogen in the canopy of rice under Free-Air CO₂ Enrichment」World Crop FACE、2012.7.9-12、Tsukuba

及川真平、Elizabeth Ainsworth「オゾン濃度勾配に沿ったダイズの葉群光合成速度の変化」第 58 回日本生態学会、2011.3.9、札幌

彦坂幸毅、衣笠利彦、及川真平、小野田雄介、廣瀬忠樹「一年生草本の種子生産の高 CO₂ 応答における機能型間差」第 58 回日本生態学会、2011.3.9、札幌

中村和輝、及川真平、廣瀬忠樹「窒素施肥がイネの分けつと葉面積動態に与える影響」第 58 回日本生態学会、2011.3.11、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 真平 (SHIMPEI OIKAWA)

茨城大学・理学部・助教

研究者番号：90400308

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し