

根の形態と機能に関する学生実験プログラム

— 根長と根域温度が出液速度に及ぼす影響 —

阿部 淳*)・森田 茂紀

東京大学大学院農学生命科学研究科

要 旨 : トウモロコシ幼植物を材料に用いて, 根系全体の活力を出液速度で評価し, 根量と根域温度によりどのような影響を受けるかを考えさせる学生実験プログラムを提案する. 綿トラップを用いた出液速度測定法と, 格子法による根長の測定法を習得させる.

キーワード : 学生実験, 根長測定, 出液速度, トウモロコシ (*Zea mays* L.)

A laboratory class programme to study root structure and function - Effects of root length and rooting-zone temperature on bleeding rate - : Jun ABE and Shigenori MORITA (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

Abstract : This programme leads students to discuss effects of root length and rooting-zone temperature on bleeding rate of maize seedlings that is measured as an index of physiological vitality of whole root system. Students also learn modified line-intersection method to measure root length.

Keywords : Bleeding rate, Laboratory class, Maize (*Zea mays* L.), Measurement of root length

1. はじめに

本稿においては, 理科系・農学系の大学生や高校生を対象に, 生物学・農学の実験実習として, トウモロコシ (*Zea mays* L.) の出液速度 (Schurr U. 1998; 阿部・本間 2003) を測定し, 根系全体の能力を根量と生理的活性の双方から検討させるプログラムを提案する.

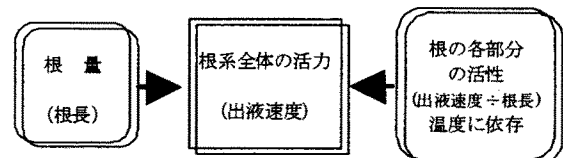
これは, 著者らの担当する東京大学農学部3年生の選択必修の実験において, 1回3時間×2回ないし3回のプログラムとして約5年間実施した経験をもとにとりまとめたものであり, 生物系の実験実習を担当されている会員の参考になれば幸いである.

2. 実験の目的

根系の役割としては, 水・養分の吸収, 植物体の支持や, サイトカイニン・ABA などの成長調整物質 (植物ホルモン) の合成などが挙げられるが, その一部は, 呼吸エネルギー依存の活動であり, 根の生理的な活力に左右される. 一方, 個体全体としてみた場合には, 個々の根の活力のほか, 根の量の多少が根系の能力に影響することも多い.

本実験では, 個体単位での根系の活力の指標として出液速度をとりあげ, トウモロコシを材

料に用いて, 温度別の出液速度と根長を測定する. 出液 (溢液) とは, 茎や葉の切り口から導管液が出てくる現象であり, へちま水がその典型である. 根が呼吸エネルギーを用いてつくりだす水ポテンシャルの勾配によって根圧が生じ, 培地 (土) から水が吸収されて茎葉部に押し上げられることで出液が生じるとされている. したがって, 出液の速度が, 根の呼吸活性やそれに依存する生理的活動の活発さの指標になると考えられる. 根量の指標となる根長, および, 生理活性に強い影響を及ぼす温度の2つの要因により, 個体の出液速度がどのように規定されているかを検討する (第1図).



第1図 根の量と活性が根系全体の活力に与える影響

3. 出液速度の測定 (実験1日目)

5-6人ずつ4-5グループに分かれて行い, 得られたデータは1グループのデータを1反復とし, 全体でまとめて解析に用いる. 所要時間は, 説明を手短に行ったとして3時間程度であ

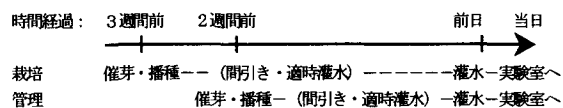
2004年5月22日受付

*連絡先 〒113-8657 文京区弥生 東京大学大学院農学生命科学研究科 栽培学研究室
Fax: 03-5841-5045 E-mail: abejun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

る。途中で待ち時間（各グループ2時間だが、グループにより早い遅いの差があるので、全体がそろって暇になるのは1時間余り）があるので、詳細な解説や他の作業をその時間に行うと良い。

(1) 材料植物の栽培と準備

材料のトウモロコシは、あらかじめ栽培しておく（第2図）。500ml程度のポット（著者らは、屋台のビールなどに使っているような、18オンスの使い捨てプラスチック・コップを用いている）の底部に排水用の小孔を開け、土を詰めて催芽したトウモロコシを5粒程度播種し、間引いて1または2株とする（学生のグループ数や恒温水槽の容量によっては、測定できるポット数が少なくなりデータの信頼性が落ちるので1ポット2個体とする）。土は、土壌とパーミキュライトを5:5で混合したものか園芸用の培土が良い。播種時期を変えて栽培し、実験時に播種後2週間と3週間になるようにする。実験の前日に十分に灌水しておく。実験に先立って排水孔から浸水しないように同型の孔無しのポットを外にはめて二重にする。



第2図 材料植物の栽培管理

各グループで2つの生育時期別に、それぞれ3ポット（計6ポット）を担当し、各ポットにグループ番号と、「2週」「3週」および「低温」「中温」「高温」を区別する標識を付ける（第1表）。同様の標識を、あとで根を保存するのに用いるポリビンにも貼っておく。各ポット2個体の場合は、個体の識別もできるようにしておく。

第1表 ポット・個体の標識の例

温度	播種後2週間		播種後3週間	
15℃	○-1a	○-1b	○-4a	○-4b
25℃	○-2a	○-2b	○-5a	○-5b
35℃	○-3a	○-3b	○-6a	○-6b

○には、グループ番号が入る。

この例は1ポット2個体の場合で、a, bが個体の区別を示す。

綿トラップに書く番号もこれにあわせて「1a」のようにすると照合しやすい。

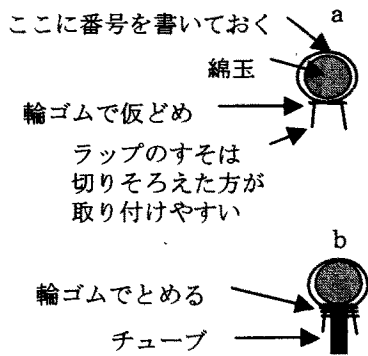
(2) 準備する器具等

全体で使う器具：恒温水槽3台。うち1台は冷却できるもの；グループ数が多い場合は数を増やす。恒温水槽は、それぞれ低温（15℃）、中温（25℃）、高温（35℃）にセットしておく。恒温水槽の数がたりないときは、季節によって中温または低温は温度調整せずに、コンテナなどに水道水を入れるだけでもよい。低温は、10℃程度の氷水でもよいし、冬期であれば水道水でも良い。要は、明瞭に異なる3水準の水温を設定することである。どのくらい温度が違うか、温度計の読みだけでなく、水に手を入れて体感させることが大切である（ただし、恒温水槽の不調で感電などしないように注意）。水量は、ポットをグループの数だけ入れた時に、水位がポット上端より少し下になるように調節しておく。

各グループで使う器具等（各グループの必要数）：油性マジック（1）、脱脂綿の玉（消毒用に薬局で売られているものが便利；個体数+ α ）、ラップ（「サランラップ」などの水を通さないもの；1巻）、ハサミ（1）、輪ゴム（個体数+ α ）、チューブ（ストローなどを長さ2cm程度に切る；個体数+ α 。トウモロコシの基部の太さに合わせて数種類用意できるとなお良い）、カッター（またはカミソリの刃；1）、小型ポリビン（個体数分）、データ表（人数分）。データ表のサンプル（MS-Word ファイル）は、<http://agro.bio.jp/lc> からダウンロードできる。

(3) 綿トラップの作成

綿玉の重量を測って記録する。1mg（0.001g）の単位まで測っておくこと。測定した綿玉はラップでくるみ込み、輪ゴムで軽く止めて綿トラップとし（第3図a）、油性マジックでラップに番号をつけておく。番号から重量と、どの個体（ポット）用であるかが参照できるように記録をとる。トウモロコシの茎葉部の太さに合わせて、適当なサイズのチューブを選び、綿トラップにつける。チューブとラップの上から、しっかり輪ゴムで止める（第3図b）。



第3図 綿トラップの作成

- a. 重さを精密に測った綿玉をラップでくるむ
- b. チューブを取り付ける。

(4) 茎葉部の切断と綿トラップの取り付け

鋭利なカッターを用いて、トウモロコシの葉鞘を地際から3-4cmの高さで水平に切る。下位葉の葉身がその高さにかかる場合は併せて切断する。下位の葉身が残っていると、蒸散のために出液速度が過小評価になる可能性がある。

切断後、直ちに、綿トラップをチューブごと切株にかぶせる。指の腹でトラップの頭を軽く叩き、綿玉をトウモロコシ葉鞘の切断面にしっかり接触させる。それぞれの綿トラップを取りつけた時刻を記録しておく。切株が太くて、用意したチューブがはまらない場合は、チューブは用いずに、綿とラップのみの綿トラップを取り付け、輪ゴムかセロテープを使って固定する。

綿トラップの取り付け完了後、直ちに低温、中温、高温の3水準の恒温槽に浸ける。ポットの上端から水が侵入しないように注意する。

(5) 出液速度の算出

それぞれの綿トラップを取りつけた時刻から2時間後に、ポットを恒温槽から取り出して綿トラップを取り外す。予備実験で出液量が十分に多いことが確かめられている場合には、1時間半でも良い。ラップをはずして手際よく綿玉を秤量する。出液採取前と後での綿重量の増加分を時間で割って、その個体の出液速度 (mg/h) とする。結果は全体でとりまとめて、各温度での出液速度の平均値を比較する。

(6) 根の洗い出し

土を洗い流し、根系を採取する。各ポット2個体の場合は、個体の標識が落ちないように注意して洗い出す。栽培中に間引きした株の根系は捨てる。空気中では根が切れやすいので、洗い出しや根を分ける作業は、コンテナやバケツ

などに水を張っておいて必ず水中で行う。出液測定に用いた個体の根系を切株ごと同じ番号のポリビンに入れ、水を加えておく。根長測定までの間、冷蔵庫に入れるか、もしくは水の代わりに50-70%のエタノール溶液を入れて保管する。

4. 根長の測定 (実験2日目)

個体ごとの、側根も含めた根長を格子法 (Marsh 1971; Tennant 1975; 山内 1998; 森田・阿部 2002) で測定する。1人1ポット (1個体) ずつを担当すれば、3時間の実験で結果が出るが、個体数が多い場合は2回に分けて実施する。

(1) 準備する器具等

小型バットまたは解剖皿、5mm角のマスキングシートまたは紙 (大きさはバットにあわせる; 時間が不足しそうな場合は1cm角の格子にする)、糸 (赤などの目立つ色のものが便利、ない場合は白糸に赤マジックで色をつける)、ものさし、計数器 (カチカチと押して数えるカウンター)、データ表、電卓。すべて人数分を用意しておくことが望ましい。このほか、必要に応じてサフラニンなどの染色液。

(2) 格子の準備と係数の算出

格子を適切な大きさに切って、バットの底に敷く。

糸を1m分測り取り、さらに適当に切り分けてランダムに格子の上に置く。糸どうしが交差しても良い。計数器を用いて、格子の線と糸が交差 (あるいは接触) している数 (N) を数える。糸の配置を換えて10-20回測定し、 $100\text{cm} = k \cdot N$ となる係数kの平均値を求める (kの理論値は、0.5cm角の格子では0.39、1cm角の格子では0.79である)。kが決まれば、Nを測定することで根長が推定できることになる。

この作業は、1日目の出液速度測定の待ち時間の間にやっても良い。

(3) 根を拡げる

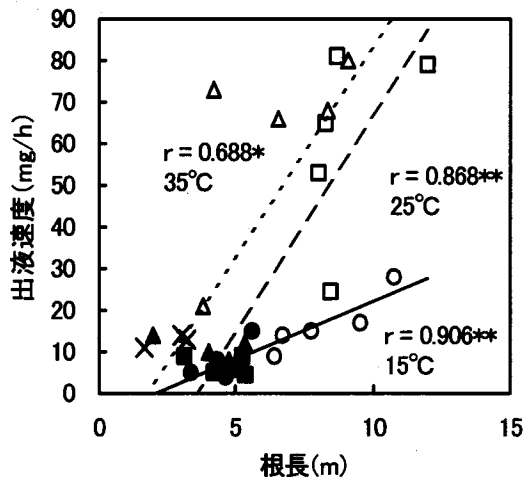
バットの中に深さ2mm程度に水を入れて、しっかり格子のOHPシート (または紙) を沈めてから、その上に長さ5-10cm程度に切り分けた根を拡げる。通常、1個体の根を一度には拡げきれないので、数回に分けて測定する。根は側根も含め、丁寧に数えやすいように拡げる。バットの底面の色が根や格子の色と同じで見づ

らい場合は、根を染色したり、バットの底に色つきのシートを敷くなどの工夫をする。白い背景にサフランなどで赤に染色した根という組合せが見やすい。格子が OHP シートの場合には、根を上げた上に OHP シートをかぶせても良い。

(4) 交点の計数と根長の算出

格子の線を端から 1 本ずつ順番に追跡して、側根も含めた根と交差（あるいは接触）する回数を、計数器を用いて数える。まず格子の縦線を順に追跡し、次に横線というように体系立てて計数する。根の方を追跡するのは数え落としが生じやすく、信頼できない（もし、時間に余裕があれば、グループ内で同じサンプルを複数の学生で数えて結果を比べてみるとおもしろい）。

上述の (2) で求めておいた係数 k を用いて、根長を算出する。通常は、栽培期間の長いトウモロコシの方が根長は長いですが、同じ栽培日数でも個体間の変異が大きいことが分かるであろう。



第4図 結果の1例

1998年度の東京大学農学部1類3年生の実験より、黒塗りは播種後2週間、白抜きは播種後3週間のトウモロコシ。●○15°C, ■□25°C, ▲△35°C, ×ヒマワリ。ヒマワリは播種後2週間の個体を25°Cで測定した。

より詳細な測定事例は、阿部ら 1998., 岡本ら 1999. を参照。

5. 結果の解析

第1日目の時点では、各温度における出液速度を比較し、その差について考察するが、その時点では、同じ温度・同じ生育期間でも個体間の変異が大きいことが多い。第2日目に、根長が分かると、温度ごとにプロットの形を変えて、

横軸に根長、縦軸に出液速度をとって、散布図を描くことができる(第4図)。このときは、生育段階の違いは無視しても良い。個体レベルの根長と出液速度との関係はどうなっているか、その関係(グラフの傾き)は、温度によってどう違うか、その理由は何か、を考察する。

出液の原動力となる根圧は、生体エネルギーに依存する。したがって、単位根長当たりの出液速度は根の呼吸速度を反映するし、呼吸速度を規定する温度条件にも影響される(山口ら 1995)。

6. 注意点と応用例

実験を成功させるためには、材料が健全に育っている必要がある。生育中に強いストレスを受けた個体は、出液がきわめて小さく測定できないことがある。測定前の光条件にも影響を受けるので(岡本ら 1999), あまり早くから実験室に持ち込むのは避ける。また、前日には十分に灌水をしておく。大きく太く育った個体の方が、出液量も多く、綿トラップの取り付けも容易である。播種時期をずらして3回播種し、播種後2週間のトウモロコシで小さすぎる場合は播種後3週間と4週間の材料を用いる。なお、著者らはデントコーンを用いているが、食用トウモロコシは、それよりも小さいことが多い。他の植物を用いても良いし種間比較もおもしろいが、綿を取りつけやすい形態で、出液量も多い植物が望ましい。

出液速度で評価できる能動的な吸水は、根の生理的な活性の指標としては良いが、晴天時の全吸水に占める割合は小さい。蒸散に伴って起こる受動的吸水との比率を調べるために、蒸散速度も測定して出液速度と検討してみても良い。この場合は、ラップでトウモロコシの植わったポットの土壌表面を覆って蒸発を防ぎ、精度0.01gの電子天秤(2,000g程度まで測れるもの)で、ポットの全重を測ってからグローブチェンバー(気温15°C, 25°C, 35°C)に入れる。1時間後に再度重さを測って、減った重量が1時間の蒸散量である。次に、同じ材料で出液速度の測定を行う。さらに、出液速度測定のために茎葉部を切り取った後、その葉身の面積(葉面積)を測れば、葉1cm²当たりの蒸散速度や、根圧で賄える吸水量(出液量)が算出できるし、葉の表面にマニキュアを塗って型を取り、顕微鏡観察して気孔密度を調べれば、気孔1個当たりの蒸散速度なども推定できる。葉面積の測定は、画像解析や自動葉面積計が使えない場合は、コピーをとって切り抜き、紙全体と、

葉形の紙の重さの比率から推定しても良い。

1-3 g 程度のより大きな綿を使えば、圃場で栽培した水稻やトウモロコシの出液速度も測定できる (森田ら 2000; 阿部・本間 2003)。出液の中には、根端で合成されるサイトカニンが含まれているので (蔣ら 1988; 阿部・森田 2003; 阿部ら 2003), 十分な量の液が採取できれば, サイトカニンの分析や生物検定の実験実習と組み合わせることもできよう。

根長測定の実用としては、側根も含めた総根長のほかに、1次根軸だけの長さや、80℃で2日間以上乾燥した根全体の乾物重を測って、「分枝指数」= (総根長-1次根長) / 1次根長、「比根長」= 総根長 / 総根重 を算出することで、側根の発達程度を検討することができる (森田・阿部 2002)。パソコンでの画像解析やルートスキャナ (富士平工業) が使える場合には、格子法と対比して測定精度を検討させても良い。著者らは、根長測定に3時間×2回を費やし、1人1-2個体を分担させ、格子法とルートスキャナ法を比較させている。学生達はえてして機械の方を信頼し、両法の結果の差違を格子法での数え違いと考察するが、ルートスキャナで根を丁寧に抜けて測定し直したら格子法の測定結果に近づくという経験を通して、機械も使い方を誤れば人間の測定より精度が劣るということを認識した学年もある。なお、格子法は Newman (1966) の考案と誤解されることが多いが、彼が提案したのはランダムに引かれた線の上に根を抜ける線交差法であり、Marsh (1971) が格子を用いることで利便性と精度を改善し、Tennant (1975) がその有効性を検証した。

参考ウェブサイト

著者らの担当した学生実験の様子や、学生への配付資料、データ表、実験結果の例、関連の実験などは、<http://agrobio.jp/lc/> で閲覧・入手できる。

引用文献

阿部淳・岡本美輪・森田茂紀 1998. トウモロコシ幼植物の出液速度に対する地温の影響. 日本作物学

会紀事 67(別 2):182-183.

阿部淳・折谷隆志・森田茂紀・萩沢芳和 2003. 水稻の乳苗移植栽培における本田の根系形成 - 栃木県の農家水田における調査事例 -. 農業および園芸 78: 498-504.

阿部淳・森田茂紀 2003. 栃木県農家水田において乳苗移植した水稻の根系調査事例 - ファイトマーに基づく形態解析と出液速度による機能評価 -. 根の研究 12: 9-13.

阿部 淳・本間知夫 2003. 生理活性の測定と評価. 森田茂紀編 根のデザイン - 根が作る食糧と環境 -. 養賢堂, 東京. pp. 48-61.

岡本美輪・森田茂紀・阿部淳 1999. トウモロコシ幼植物の出液速度に対する温度の影響. 日本作物学会紀事 68(別 1):178-179.

Marsh B. a'B. 1971. Measurement of length in random arrangements of lines. Journal of Applied Ecology 8:265-267.

森田茂紀・岡本美輪・阿部淳・山岸順子 2000. 圃場で栽培したトウモロコシの出液速度と根量との関係. 日本作物学会紀事 69:80-85.

森田茂紀・阿部淳 2002. 根量を測る. ファイトテクノロジー研究会編 ファイテク How to みる・きく・はかる - 植物環境計測 -. 養賢堂, 東京. pp. 74-75.

Newman E.I. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. Journal of Applied Ecology 3:139-145.

Schurr U. 1998. Xylem sap sampling - new approaches to an old topic. Trends Plant Sci. 3:293-298.

蔣 才 忠・平沢 正・石原 邦 1988. 水稻多収性品種の生理生態的特徴について, アケノホシと日本晴の比較. 第2報 個葉光合成速度の相違とその要因. 日本作物学会紀事 57:139-145.

Tennant D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. Journal of Ecology 63: 995-1001.

山口武視・津野幸人・中野淳一・真野玲子 1995. 水稻の茎基部からの出液速度に関する要因の解析. 日本作物学会紀事 64:703-708.

山内 章 1998. 根長の測定法. 根の事典編集委員会編. 根の事典. 朝倉書店, 東京. pp. 380-382.