

## 根系サンプリング時における固定および染色によって乾物重に変化はあるか？

小川 敦史

秋田県立大学作物生態学講座

**要 旨：**一般的に根長などの根の形態学的形質の測定は、固定（および染色）した後に行われる。そのため、その後同じサンプルを用いて測定した場合、固定せずに測定した乾物重と差異が生じる可能性が考えられる。そこで、根系をサンプリング後に固定しないサンプル（「測定法1」）、固定したサンプル（「測定法3」）、固定および染色したサンプル（「測定法2」）を用いて根長と乾物重の関係を調査し、サンプリング後の根系の固定および染色が、その後の乾物重の測定に与える影響について検証した。根長と乾物重の相関関係を取り、それぞれの回帰直線の「傾きの差の検定」を行ったところ、3測定法の傾きの間に有意差は認められなかった。一方、単位根長当たりの乾物重を比較したところ、測定法1と2および3の間に有意差があり、測定法2および3の単位根長当たりの乾物重は測定法1の約70%であった。以上の結果は、サンプルを固定した後に乾物重を測定した場合には、相対的に乾物重の値を比較することは可能であるが、実際の乾物重と差が生じている可能性を考慮に入れておく必要があることを示していた。

**キーワード：**乾物重、固定、根長、染色、単位根長当たりの乾物重

**Is the dry weight changed by the fixation and staining at the sampling of root system?** : Atsushi Ogawa  
(*Department of Biological Production, Akita Prefectural University*)

**Abstract:** The morphological characters in root systems, such as root length, are usually measured after fixation (and staining) and it is assumed that the dry weight without fixation is different from that with fixation (and staining). In this study, the relationship between root length and dry weight was investigated for samples without fixation ("Method 1"), with fixation ("Method 3"), and with fixation and staining ("Method 2"), and the effect of fixation and staining on dry weight was examined. The correlation between root length and dry weight was assessed, and the resulting regression slopes of the three treatments were compared. There were no significant differences among the regression slopes. When the dry weight per root length resulting from the three treatments were compared, there was a significant difference between "Method 1" and "Method 2 or 3", such that the dry weight per root length of "Method 2 and 3" was about 70% that of "Method 1". This result shows that dry weight is decreased about 30% by the fixation. These results suggest that when the dry weight is measured after fixation, the dry weight can be compared relatively, and the possibility that it may be different from true dry weight must be considered.

**Keywords:** Dry weight, Dry weight per root length Fixation, Root length, Staining

根量を把握することは、根系の形態を研究する場合の前提として必須である（森田と阿部, 2001）。根量を示す指標としてこれまでに乾物重、数、長さ、体積、表面積など様々な形態的形質が測定されてきており、それぞれに対応した測定方法が考案されてきた（山内, 1998）。そのうち、乾物重以外の形態学的形質の測定にはある一定の時間を要するため、サンプリング後に固定（および染色）した後、測定することが一般的である。

乾物重は地上部ー地下部間の乾物分配を問題にするときには必須である。一方で根の機能を

考えるときには、その値にあまり意味がないことが多いが、測定が比較的容易で他の形態学的形質と相関関係が認められることがあるので、根系の発達程度を大まかに把握するために利用される場合がある（山内, 1998）。その他の形質、特に根長は養水分吸収などの根の機能性を反映している指標であり、ルートスキャナーやコンピュータを利用した画像解析をはじめとする簡便な測定方法が開発されたこともあり広く利用されている（山内, 1998）。

根系の形態的特徴を得て、さらに地上部との物質分配を簡便に評価するためには根長と根の

乾物重の両者の測定が必要になってくる。そのため、これらの指標は根系研究の様々な場面において利用されている。サンプル数の関係や根系採取の手間を考慮に入れると、根長測定を行ったサンプルを乾燥させた後、乾物重の測定を行う研究例が認められる(例えば Bañoc et al., 2000; 森田と奥田, 1994)。先にも述べたように、一般的に根長の測定はサンプリング後の固定および染色を経て行われる。したがって固定および染色後のサンプルを用いて測定される乾物重は、固定を行わずに乾燥して測定した実際の乾物重と異なるのではないかと考えられる。しかし同サンプルを用いて根長と乾物重を測定したこれまでの研究では、固定によって乾物重が変化するかもしれないということを考慮に入れながら、得られた乾物重の値を相対的に比較してきた。

本研究では、根をサンプリング後に固定しないサンプル、固定したサンプル、固定および染色したサンプルを用いてそれらの乾物重を比較し、さらに根長と乾物重の関係を調査し、サンプリング後の根系の固定および染色が、その後の乾物重の測定に与える影響について検証した。

## 材料と方法

供試材料にはトウモロコシ (*Zea mays* L.; 品種 ホワイトポップ) を用いた。種子を蒸留水で洗浄し、湿らせたろ紙をしいたシャーレ中に置床した後、28°C暗黒条件の恒温器内で3日間催芽処理を行った。3日後、種子根は約10 mm伸長した。

直径7.5 cm、高さ12 cmの400 ml 蓉のプラスチックカップの底面に、直径7 mmの穴を3つ開け、赤玉土を充填し、催芽した種子を播種した。栽培はグロースチャンパー (MLR-350H, SANYO) 内で行い、温度28°C、湿度70%、12時間日長、光合成有効放射量  $320 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に設定した。

播種後8日目、9日目、10日目に種子根および種子根軸上に発生している側根を採取した。

種子根軸上には一次側根のみ発生していた。その後、以下に示す3通りの方法で根長を測定した。

- 1) 水を入れたバットの中に根を入れ、サンプリング後1時間以内に、種子根長ならびに側根長を、定規を用いて計測した(「測定法1」)。
- 2) サンプリング直後に0.25% (w/w) coomassie brilliant blue を含む FAA (50%エタノール: 酢酸: ホルマリン=8:1:1) に浸漬し、3日以上静置して固定した後、30分間水洗し、種子根長ならびに側根長を、定規を用いて測定した(「測定法2」)。
- 3) サンプリング直後にFAAに浸漬し、3日以上静置して固定した後、30分間水洗し、種子根長ならびに側根長を、定規を用いて測定した(「測定法3」)。

各根長測定後、80°Cの乾燥機内で2日間乾燥し、乾物重を測定した。

各根長測定方法のために、各採取日にそれぞれ3~5サンプル採取し、根長ならびに乾物重の測定を行った。

## 結果

第1表に各サンプリング日での各測定法で測定した乾物重の平均値を示した。播種後8日目では「測定法3」と「測定法1」および「測定法2」の間に有意な差があり、播種後10日目では「測定法1」と「測定法2」および「測定法3」の間に有意な差があった。播種後9日目では、各測定法の間に有意な差は認められなかった。

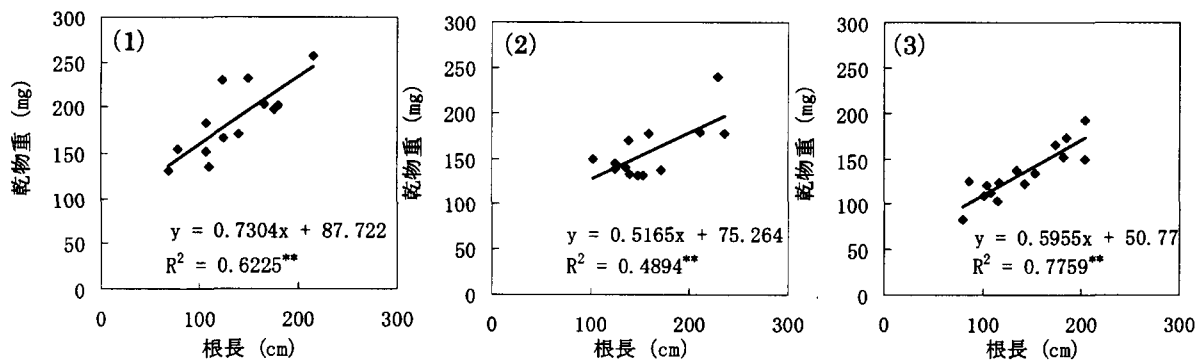
第1図に、各測定法における根長と乾物重の関係を示した。各根長測定方法において根長の増加にともなって乾物重は増加した。根長と乾物重の相関をとると「測定法1」(第1-1図)、「測定法2」(第1-2図)、および「測定法3」(第1-3図)の各測定法において、両者の間に有意な相関関係が認められた。根長と乾物重の間に有意な相関が認められたことから、各測定法における一回帰式の「傾きの差の検定」(市

第1表 各サンプリング日での各測定法で測定した乾物重の差異

	乾物重 (mg)		
	播種後8日目	播種後9日目	播種後10日目
測定法1	154.5 ± 10.90 a	175.5 ± 19.83 a	218.4 ± 11.27 a
測定法2	155.0 ± 7.638 a	154.6 ± 9.563 a	162.4 ± 21.04 b
測定法3	112.2 ± 8.529 b	131.0 ± 10.01 a	157.8 ± 11.67 b

各値は3から5個体の平均値±標準誤差を示す。

同一アルファベットはダンカンの多重検定において5%水準で有意差がないことを示す。



第1図 各測定法における根長と乾物重の関係

(1) サンプル直後に根長を測定した場合(「測定法1」)

(2) サンプル直後に0.25% (w/w) coomassie brilliant blueを含む FAAに浸漬し、固定し根長を測定した場合(「測定法2」)

(3) サンプル直後にFAAに浸漬して固定し根長を測定した場合(「測定法3」)

\*\*は1%で有意に相関があることを示す。

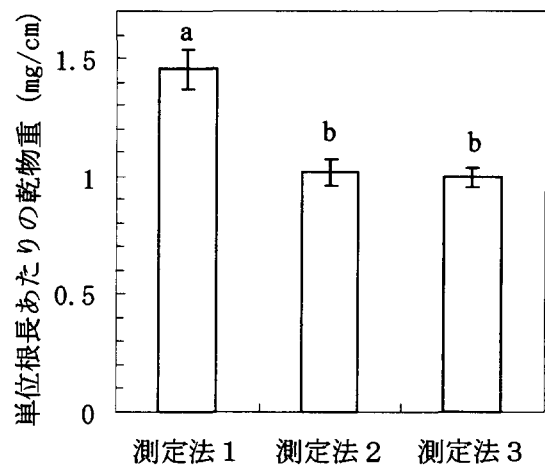
原, 1990) を行い, 測定法の違いによる根重と根長の関係の差異について検討した。「測定法1」における傾きは0.7304(第1-1図), 「測定法2」における傾きは0.5165(第1-2図), 「測定法3」における傾きは0.5955(第1-3図)であった。「測定法2」の傾きは「測定法1」の71%, 「測定法3」の傾きは「測定法1」の82%, 「測定法2」の傾きは「測定法3」の87%であったが, それぞれの測定法における傾きの間に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

次に, 単位根長あたりの乾物重を比較した(第2図)。単位根長あたりの乾物重は, 第1図において根長と乾物重の値を示した各点と原点を結んだ直線の傾きによって示される。「測定法1」と「測定法2」および「測定法3」との間には, 有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。一方「測定法2」と「測定法3」との間には有意な差は認められなかった。有意な差が認められた「測定法1」と「測定法2」および「測定法3」の単位根長あたりの乾物重を比較すると, 「測定法2」の単位根長あたりの乾物重は「測定法1」の70%, 「測定法3」の単位根長あたりの乾物重は「測定法1」の69%であった。

### 考 察

本研究では, 根をサンプリング後に固定しないサンプル, 固定したサンプル, 固定および染色したサンプルを用いてそれらの乾物重を比較し, さらに根長と乾物重の関係を調査し, サンプリング後の根系の固定および染色が, その後の乾物重の測定に与える影響について検証した。

各測定方法における乾物重を比較したところ, サンプリング日によって各測定法間での有意差の有無が異なり, 一定の傾向を得ることができ



第2図 各測定法における比根長の差異

各値は13から15個体の平均値±標準誤差を示す。

同一アルファベットはダンカンの多重検定において5%水準で有意差がないことを示す。

なかった。これは, 各供試個体の根系の生長の個体間差が大きかったためであると考えられた。したがって, 単純に各測定法間の乾物重の差異を比較するのではなく, 根長と乾物重の関係から, サンプリング後の根系の固定および染色が乾物重に与える影響について検証する必要があると考えた。

そこで, 根長と乾物重の関係について調査した。根長と乾物重の間に相関関係が存在した結果(第1図)をもとに, 両者の関係の一次回帰式における傾きの比較を行ったところ, 「測定法1」に比べ「測定法2」の傾きは71%「測定法3」の傾きは82%, 「測定法2」の傾きは「測定法3」の87%であったが, いずれの測定法の

傾きの間にも有意差は認められなかった。しかしながらこの結果は、「Y切片の値を考慮に入れずに、根長と乾物重の間に相関関係が存在する範囲において」成立する結果であるため、生育時期が異なるサンプル間で比較する場合にはこの関係が成り立たず、固定を行うことで乾物重に変化が現れる可能性があることを考慮しておく必要があることが示唆された。

一方、各測定法における単位根長当たりの乾物重を比較したところ、固定したサンプルを用いて測定した「測定法2」および「測定法3」の単位根長当たりの乾物重は、「測定法1」の実際の単位根長当たりの乾物重に比べて約70%の値であり、有意に小さかった(第2図)。このことは、固定によって細胞内の溶質などが流出し、乾物重が実際の乾物重より約30%減少することを示していた。固定した「測定法3」と、固定と染色を行った「測定法2」では差がなかったことから、乾物重は固定により減少し、その際の染色によっては変化しないことが示唆された。

本研究では、根においてサンプリングの後の固定およびその後の染色が乾物重に与える影響について検証した。乾物重は、根系研究の様々な場面で用いられる有用な指標である。本研究

では、単位根長当たりの乾物重は固定により実際の乾物重より約30%減少することが明らかになった。この結果は、根長やその他の形態学的形質を測定するためにサンプルを固定した後乾物重を測定した場合には、相対的に乾物重の値を比較することは可能であるが、実際の乾物重と差が生じている可能性を考慮に入れておく必要があることを示していた。

## 引用文献

- Bañoc, D.M., Yamauchi, A., Kamoshita, A., Wade, L.J., Pardales, J.R. Jr. 2000. Dry matter production and root system development of rice cultivar under fluctuation soil moisture. *Plant Prod. Sci.* 3: 197-207.
- 市原清志 1990. バイオサイエンスの統計学 正しく活用するための実践論理. 南江堂. 東京. pp218-223.
- 森田茂紀, 阿部淳 2001. 水田における根量の測定と評価法—円筒モノリス法—. *根の研究* 10: 13-17.
- 森田茂紀, 奥田浩之 1994. 土壌水分条件がコムギ幼植物の根の発育, とくに種子根の分枝に及ぼす影響. *日作紀* 63: 418-422.
- 山内章. 1998. 根の測定形質と形態指標. *根の事典* 編集委員会編 根の事典. 朝倉書店. 東京. pp374-375.