

# TTC染色による ササ植生の活性度評価手法

## ESTIMATION METHOD OF THE ACTIVITY OF DWARF BAMBOO USING TTC DYEING

赤岩 孝志<sup>1</sup>・武田 一夫<sup>2</sup>・村上 泰啓<sup>3</sup>

Takashi AKAIWA, Kazuo TAKEDA and Yasuhiro MURAKAMI

<sup>1</sup>正会員 石狩川開発建設部 夕張シューパロダム総合建設事業所 (〒068-0545 夕張市南部東町)

<sup>2</sup>帯広畜産大学 地域環境学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地)

<sup>3</sup>正会員 寒地土木研究所 寒地河川チーム (〒062-8602 北海道札幌市豊平区平岸1条3丁目1番34号)

Developing an estimation method for viability of dwarf bamboo (*Sasa senanensis* (Franchet et Savatier) Rehder var. *senanensis*) rhizomes, the absorbance as an activity of the rhizomes was measured using TTC (triphenyl tetrazolium chloride) dyeing. As a result, the absorbance peak in living rhizomes appeared at 480nm of wavelength, while that in dead ones did not. Moreover, through a series of tests on hydrological environment such as groundwater level, duration of existence below water level and a change of water level, it was clarified that dwarf bamboo loses the activity below water level more than 30 days. Based on these findings, the method expects to be used as the objective judgment for viability of dwarf bamboo, when we conduct the techniques to prevent dwarf bamboo from invading a wetland at Sarobetsu in northernmost Hokkaido by controlling the water level.

**Key Words :** wetland, dwarf bamboo, TTC, absorbance, groundwater level

### 1. はじめに

北海道北部, 天塩川水系サロベツ川の中・下流部に広がるサロベツ湿原(図-1)は, 昭和49年に利尻礼文サロベツ国立公園の一部にも指定され, 貴重な動植物の遺伝資源, 洪水調節能, 水資源確保, 環境教育の場, 観光資源といった多角的な機能を有している。ところが, ここ数十年にわたる湿原周辺域の排水路整備等の開発の影響や, 近年の水文環境の変化<sup>1)</sup>も相まって, 湿原域の乾燥化が進んでおり, 湿原域へのササ(クマイザサ: *Sasa senanensis* (Franchet et Savatier) Rehder var. *senanensis*)<sup>2)</sup>の侵入が問題となっている。著者らは, 既往の研究<sup>3)</sup>において, 堰上げにより地下水位が高く維持された領域でササの生育が抑制されていることをヒントに, 地下水位調節によるササ侵入抑制効果を調査してきた<sup>4)</sup>。しかし, ササの生死の判定評価は主観的なもので時間を要し, 客観的で迅速な判定手法の開発・導入が課題であった。

本研究では, この地下水位調節によるササの生死(活性度)を定量的に評価する手法の開発を目的に,

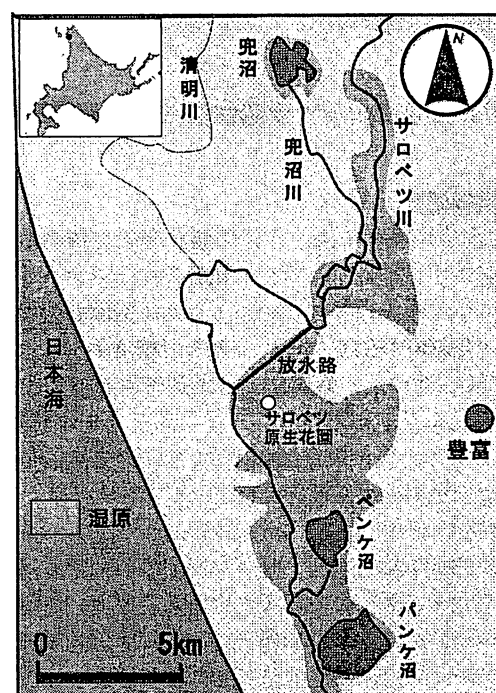


図-1 サロベツ湿原域の模式図

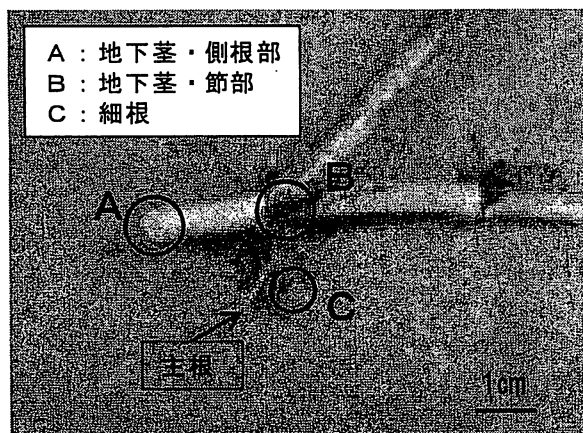


図-2 染色に用いたササ地下茎の部位

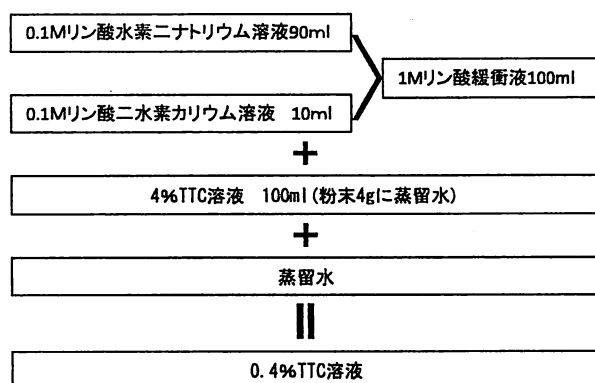


図-3 TTC試薬の調整

TTC(トリフェニルテトラゾリウムクロライド)を用いたササ地下茎染色と、吸光度の測定による活性度の定量的な評価手法の有効性を検証した。つぎに、地下水位、湛水に晒した期間、および地下水位変動がササ地下茎に及ぼす影響を室内試験して、この手法の適用性を調べた。

## 2. TTC染色によるササ活性度・評価手法の検証

### (1) 試験概要

TTCによる染色手法は、主に農業分野で作物の活性度の評価に使用されている<sup>5a)</sup>。植物体のミトコンドリア内では、好気呼吸の過程において、クエン酸回路中のコハク酸脱水素酵素が働くため、生きた植物体からは水素が発生する。TTCは、水素によって還元されることで水に不溶な赤色を呈するTPF(トリフェニルフォルマゼン)を生成するため、生きた植物体をTPFで赤色に染色し、その吸光度で植物の活性度を測ることができる。

検証試験の手順は、初めにTTCによる染色のササへの適用可能性をみるため、サロベツ湿原に隣接する圃場で採取したササ地下茎を用いて、染色を試みた。供試体には、活性度の高いササの指標として採取後実験室に直送したササ地下茎、活性を失ったササの指標として採取後120日間保管した地下茎と熱湯処理後に冷凍した地下茎



図-4 細断したササ地下茎の切片(側根部)

を用いた。各地下茎は、側根部と節部、細根の部位別(図-2)に細断する。細断は、薄ければ薄いほど染色が容易になるが、薄すぎると組織液が流出するため、顕微鏡観察も可能で、染色に最適である1mm程度の厚さを行った。それぞれの切片0.5gと0.4%TTC溶液(試薬調整の方法は図-3)10mlをツンベルク管に投入してアスピレーターで排気、アルミ箔で覆った遮光状態で30℃の恒温槽で2時間静置した後、2規定硫酸を加えて反応を停止させた。遮光は、TTCが光によって分解される性質を持つので、試薬の光による分解を防ぐねらいがある。

以上の染色工程後、切片の顕微鏡観察と吸光度の測定を行った。ここで、生成される色素TPFは水に不溶なため、そのままでは細胞内に残留し、溶液に溶出ししないと正確な吸光度の測定が行えない。このため、吸光度の測定には、切片を粉碎してTPFを溶出させる必要がある。試験に使用する切片は染色のために細断しているため、時間をかけてもホモジナイザー等の機械粉碎では十分な粉碎が行えない。そこで、既往の研究<sup>5)</sup>を参考に、有機溶媒として酢酸エチルを50ml加えた上で、すり鉢に切片と石英砂を投入して人力で5分程度粉碎する手法を採用した。以上の方法で粉碎した試料から上澄み10mlを採取し、光路長50mmのセルに入れて、分光光度計(日本分光工業社製、V520-SR)を用いて波長400~600nmまで10nmごとに透過光強度Iを測定した。吸光度ABSは、無次元量で(1)式により算出される。なお、 $I_0$ は入射光強度を示す。

$$ABS = \log_{10}(I_0/I) \quad (1)$$

### (2) 試験結果

細断した切片(図-4)は、染色後に側根部の表皮細胞以外の生きた活性のある地下茎試料では、いずれの箇所にも細胞内に染色されたミトコンドリアが顕微鏡観察で確認された。しかし、明らかに活性を失った細胞は、染色されなかった。その他の植物と同様に、TTCによる染色はササ地下茎でも可能であることを確認した。

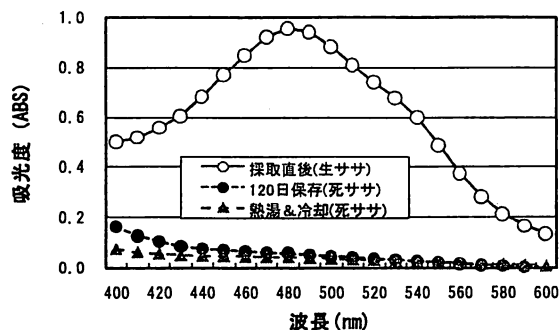


図-5 生きたササ、および死んだササの指標である吸光度

図-5に、各地下茎切片を染色して測定した吸光度スペクトルのグラフを示す。生きたササの指標である採取直後の地下茎では、波長480nm付近にピークが現れ、その数値が1.0付近と大きな値を示している。これに対して、活性を失ったササの指標である120日保存した地下茎と熱湯&冷却処理を行った地下茎では、最大でも数値が0.2未満であり、ピークも見られない。

以上より、ササ地下茎への染色手法と、それを用いた活性度の評価は有効であると判断した。

### 3. 水条件の違いによるササ活性度の比較

#### (1) 試験概要

現地で地下水位を調節してササ侵入を抑制する際に、地下水位や湛水期間など効果的な水条件を設定する必要がある。そこで、2章で示した評価手法の実験への適用性をみると同時に、水条件の目安を把握するため、水条件を変えてササ地下茎の活性度を室内試験で調べた。試験は、①地下水位の差によるササ地下茎活性度の違い、②湛水期間の差によるササ地下茎活性度の違い、③地下水位の変動によるササ地下茎活性度の違い、である。

供試体は、直径約5mm、長さ約20cmの節部を4つ含む地下茎で、主根を約2cm残して細根を除去し、1条件3本とした。これらを無栄養のケイ砂中に表面（深さ0cm）から深さ2cmに埋設した。地下水位は、深さ0cm（湛水）、2cm（地下茎と同水準）、10cm（不飽和）とした。試験①では、地下水位の違いが及ぼす生育への影響をみるため、これら3種の水位で60日間生育させた後、地下茎の活性度を調べた。試験②では、湛水期間の違いが及ぼす生育への影響をみるため、地下水位深さ0cmの湛水状態で、それぞれ10日、20日、25日、27日、30日、40日、50日生育させた後、活性度を調べた。ここで、25日、27日は、著者らの既往研究<sup>9)</sup>で定性的に26日前後の湛水期間で地下茎が枯死したことから設定した。試験③では、湛水開始10日、20日、30日、40日後に地下水位を地表面から10cm（不飽和）に変動させて、さらに20日間生育した。この地下茎の活性度と、全期間湛水の地下茎の活性度とを比較し、地下水位の変動が活性度へ及ぼす影響を調べ

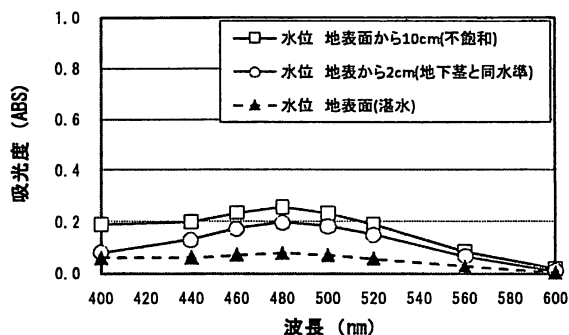


図-6 地下水位の違いによるササ地下茎の活性度

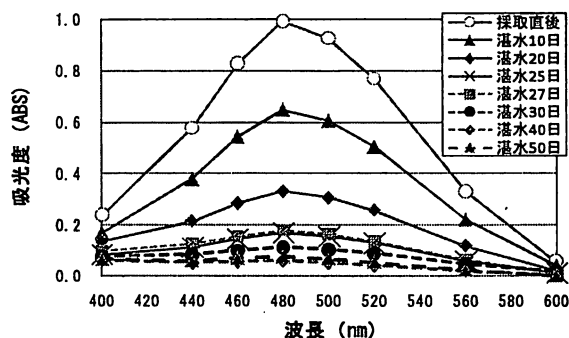


図-7 湛水期間の違いによるササ地下茎の活性度

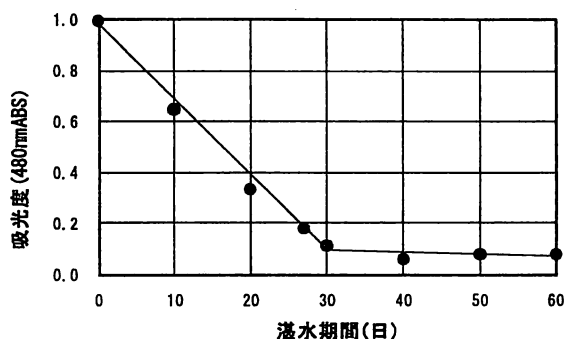


図-8 湛水期間と吸光度のピーク(480nm)との関係

た。吸光度の測定は、2章でピークを示した波長480nmを中心に400～600nmの範囲で440～520nmは20nmごと、他は40nmごとに行った。吸光度は、同一条件で行った3供試体の平均値である。

#### (2) 試験結果

試験①の地下水位の違いによる、ササ地下茎の活動度を図-6に吸光度で示す。生ササに比べていずれの条件も活性度は低下しているが、湛水条件下のものがピークも見られず、値も低いことから、ササ地下茎は湛水条件下で生育に大きな影響を受けることが認められた。また、試験②の湛水期間の違いによる、ササ地下茎の活性度を図-7に示す。採取直後から吸光度は低下し続け、ピークも小さくなるが、湛水期間が30日を超えると、湛水期間が長くなっても吸光度に大きな変化はなく、ピークも不明瞭になる。このピークに着目し、湛水期間とピークを示す波長480nmの値との関係を図-8に表した。結果、吸

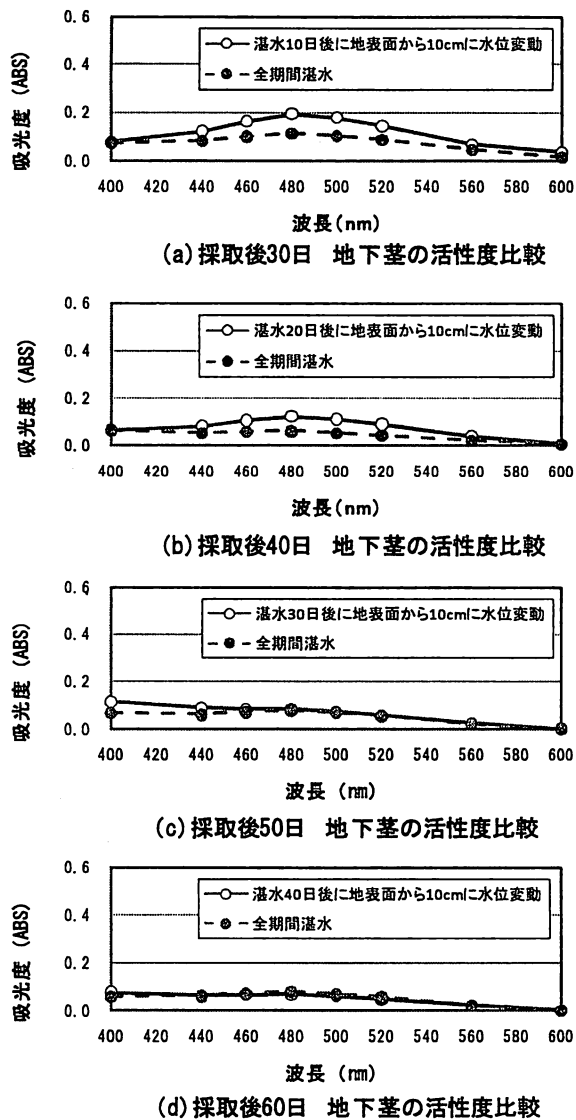


図-9 全期間湛水と地下水位変動の地下茎活性度の比較

光度は採取直後から湛水期間の増加に伴って直線的に減少し、30日付近から横ばいになる。すなわち、30日を越えると、ササ活性度が失われ、2章の評価手法の検証で行った試験結果(図-5)の死ササの指標と同様の傾向を示している。このことは、著者らの既往研究<sup>4)</sup>で、定性的に26日前後の湛水期間で地下茎が枯死したことを裏付けている。

試験③の地下水位の変動による地下茎の活性度を図-9に示す。(a)、(b)においては全期間湛水と不飽和に変化させた地下茎の間に差が見られるが、地下茎が活性を失うとみられる30日以上湛水させた(c)、(d)では両者に差は見られない。また、図-6、図-7の結果を参考に、図-9(a)(b)の水位変動の結果では、湛水状態から不飽和状態に移行しても、完全な死滅には至っていない。以上から、活性度に基づく完全な死滅には、30日程度の湛水が必要であることを示唆している。

上記3種の試験から、TTC染色による活性度はササの生

死判定へ適用可能であることが示された。

#### 4. まとめ

本研究で得られた結果を、以下にまとめた。

##### a) TTC染色によるササ活性度評価手法の検討

ササ地下茎は、他の植物と同様にTTCによる染色が可能であった。切片作成や染色後の粉碎処理を適切に行えば、吸光度が表す活性度でササの生死を定量的に判定でき、この評価手法の有効性が示された。

##### b) 水条件の違いによるササ活性度の比較

上記の染色手法を用いて、種々の水条件下でササ地下茎の活性度を測定した結果、地下水位によってその活性が大きく影響を受けることが認められた。特に、湛水状態で30日間を経過させると殆ど活性がなくなった。また、湛水後に地下水位を不飽和状態に変動させた試験では、全期間湛水させた地下茎と一定期間後に水位を変動させた地下茎との間で活性に差が見られ、不飽和状態では死滅に至っていない。湛水期間が30日を越えることで、本試験の条件とする、ササの完全死滅が達成される。以上から、こうしたササ生死判定に、本評価手法が適用可能であることが示された。

本試験により、湛水条件下でササ地下茎の生育は抑制され、その活性度を定量的に評価できた。今後、湿原へのササ植生侵入抑制手法の検討において、現地の条件に則したさらなる試験を行っていく必要がある。

謝辞：本研究を行うにあたり、ササ地下茎の染色手法の確立において、株式会社福田水文センター環境水工部の杉原幸樹氏には多大なるご協力を頂いた。ここに記して謝意を表する。

#### 参考文献

- 1) 羽山早織, 中津川誠: 湿原植生の変化をもたらす水文要因の解析, 水工学論文集, 第48巻, pp. 391-396, 2004
- 2) 鈴木貞雄: 日本タケ科植物総目録, 学習研究社出版, PP. 174-175, 1978.
- 3) 赤岩孝志, 山下彰司, 村上泰啓: 地下水位の調節による湿原植生の保全と復元, 河川技術論文集, 第13巻, pp. 255-260, 2007
- 4) 赤岩孝志, 山下彰司, 村上泰啓: 地下水位の調節によるササ地下茎の生長抑制実験, 平成20年度土木学会全国大会, 第63回年次学術講演会公演概要集, VII-168, 2008
- 5) 松本和浩, 田村文男, 千種弼, 池田隆政, 今西久美子, 田辺賢二: マンシュウマメナシ台木によるニホンナシの耐塩性向上, 園芸学研究, Vol. 6, No. 1, pp. 47-52, 2007.
- 6) 清水矩宏: 暖地型牧草種子のTTC検定による活力診断, 九州農業研究, 第46号, pp. 187, 1984.

(2009. 4. 9受付)