



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	同化箱法による器官や個体レベルのガス交換
Author(s)	野田, 響; 村岡, 裕由
Description	2章 個体・環境の測定 2. 個体から群落スケールのCO2ガス交換 a
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 95-101
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39106
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-017.pdf



2. 個体から群落スケールの CO₂ ガス交換

a. 同化箱法による器官や個体レベルのガス交換

野田 響¹⁾, 村岡 裕由¹⁾

本稿では、同化箱（チャンバー）を用いた植物体の器官（葉、茎、根）や個体レベルの CO₂ ガス交換速度の測定方法について概説する。これらのデータを植物の生育環境での気象条件と合わせて解析することにより、生育環境での物質生産を推定できる。

CO₂ gas exchange measurements of a whole-plant

Hibiki Noda and Hiroyuki Muraoka

Measurements of photosynthetic and respiratory CO₂ exchange responses of leaf, stem and root to environmental regimes such as light and temperature by using a cuvette (chamber) provide us with mechanistic estimation of *in situ* photosynthesis and respiration at whole plant scale, which are crucial to deepen our understanding on the matter economy of plants in their natural habitats.

2.a.1 はじめに

同化箱法とは、アクリルやガラス、金属製のケースに植物体を入れて空気を流し、ケースに流入する空気と排出される空気の CO₂ 濃度の差から、植物体の CO₂ ガス交換（光合成、呼吸）を求める方法である。植物サンプルを覆うケースを同化箱（チャンバー）と呼ぶ。空気の CO₂ 濃度は赤外線ガス分析計（Infra Red Gas Analyzer: IRGA）で測る。植物体が光合成をすればチャンバーから排出される空気の CO₂ 濃度は低下し、逆に呼吸をすれば CO₂ 濃度は上昇する。同化箱法には、閉鎖系システムと開放系システムがある（図1）。多くの場合には、開放系システムが用いられる。開放系システムでは、一定濃度の CO₂ を含む空気（リファレンスガス）を送り、チャンバーから排出される空気（サンプルガス）の CO₂ 濃度を測定することによって CO₂ 濃度の差を検出し、チャンバー内の植物体の光合成速度あるいは呼吸速度を算出する。

同化箱法は、葉や茎、根などの器官や個体レベルの光合成や呼吸速度の環境応答の測定に用いられる。また時には草本群落のガス交換の測定にも適用できる。測定対象は研究目的に応じるが、同化箱法は、特に植物の物質生産や成長の環境応答を定量的に理解する研究において基本的な手法である。同化箱法によって測定した光合成や呼吸速度を、様々な光や温度、水分条件のもとで測定し、さらに生育環境での微気象観測データと照合するこ

とによって、生育環境での個体の物質生産の推定が可能となる^{1),2)}。また、1年を通じて同化器官と非同化器官の

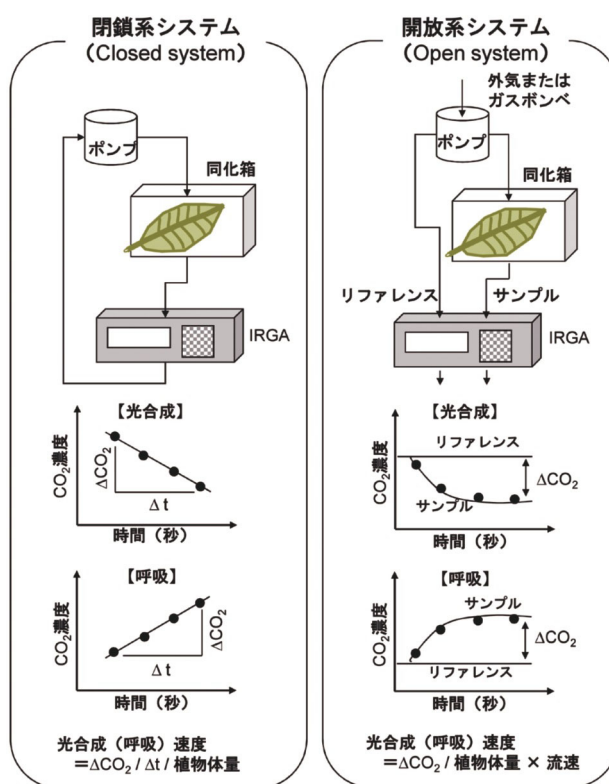


図1: 植物の CO₂ ガス交換を測るためのシステムの概要。閉鎖系システム(左)では、空気をシステム内で繰り返し循環させながら CO₂ 濃度の変化を測定することによって、植物体の呼吸速度（あるいは光合成速度）を求める。開放系システム(右)では、一定濃度の CO₂ を含む空気をチャンバーに通気し続け、チャンバーから放出される空気の CO₂ 濃度との差から呼吸速度（あるいは光合成速度）を求める。

1) 岐阜大学 流域圏科学研究センター

光合成および呼吸活性を測定することによって、光合成や呼吸のフェノロジーと個体の物質経済について実験的に推定することもできる³⁾。

近年、個葉の光合成や呼吸速度は、開放系システムである携帯型の光合成測定装置 (Li-Cor 社の LI-6400, Heinz-Watz 社の GFS-3000, CID 社の CI-340 など) を用いて測定されることが多くなっている。これらの機器は光強度や温度、湿度、CO₂ 濃度の制御が可能であり、個葉の CO₂ ガス交換反応を実験室内でも野外でも比較的簡便に測定できる⁴⁾。一方で、これらの携帯型測定機器が備えるチャンバーは小さく、測定対象の葉の一部しか測れないため、気孔開度の不均一性や、葉内の CO₂ 拡散の不均一性を考慮した測定を行うためには、一枚の葉を十分に覆うことのできるチャンバーを備えた開放系システムの構築と適用が有効である。本章では、まず個葉の CO₂ ガス交換 (光合成、呼吸) の測定方法について概説し、次に葉以外の器官や個体全体の呼吸速度の測定方法について述べる。

2.a.2 個葉の光合成および呼吸測定システム

個葉の光合成速度を測定するためには、光合成速度の制限要因である光 (光合成有効放射) や温度、湿度、CO₂ 濃度 (光合成速度の決まる仕組みについては 1a 章を参照) を制御できるシステムを構築する。現在市販されている携帯型光合成蒸散測定装置のほとんどはこれらの機能を備えている。しかしこれらの機器では測定が個葉の一部分に限られたり、あるいは測定温度範囲が限定的な

場合がある。その場合には測定システムの自作が薦められる。図 2 に一般的な個葉ガス交換測定システムの概略を示す。このシステムは、一般的な開放系システムと同様に、①チャンバーに空気を送り込む送風系、②チャンバーとその内部環境を制御する装置を含む同化箱系、③試料 (サンプル) 空気の CO₂ 濃度を測定する分析系、から成る。以下、それぞれについて概説する。

2.a.2.1 送風系

光合成速度の測定は、一定の CO₂ 濃度と湿度 (水蒸気濃度)、温度条件を備えた空気を葉に供給することによって実現する。したがって送風系では、CO₂ 濃度、湿度、温度の制御がシステムの要である。測定に用いる空気の CO₂ 濃度は、CO₂ を含まない標準ガス (窒素と酸素の混合) と高濃度 CO₂ ガスを混合することによって調整する。混合された空気はコックなどを用いて 2 系統に分け、一方はリファレンスガスとして IRGA (図 2 の IRGA-1) に送り、他方はサンプルガスとしてチャンバーに送られる。

同化箱に送られる空気は水を入れたガラス瓶を通して予め加湿する。この加湿用ガラス瓶での空気のリークが生じないように密閉性に留意する。加湿用ガラス瓶に空気を導入するチューブは瓶内の水に漬け、加湿後の空気を瓶から出すチューブは水に漬けないように十分注意する。チャンバーに送られる空気の温度制御のために、加湿用ガラス瓶は恒温水循環装置 (タイテック株式会社のクールニットなど) を着けた恒温水槽に浸すとよい。

加湿された空気の温度と湿度を温湿度計 (例えば、ヴァイサラ社の HMP35A) で測定し、再び流量計で流量を確

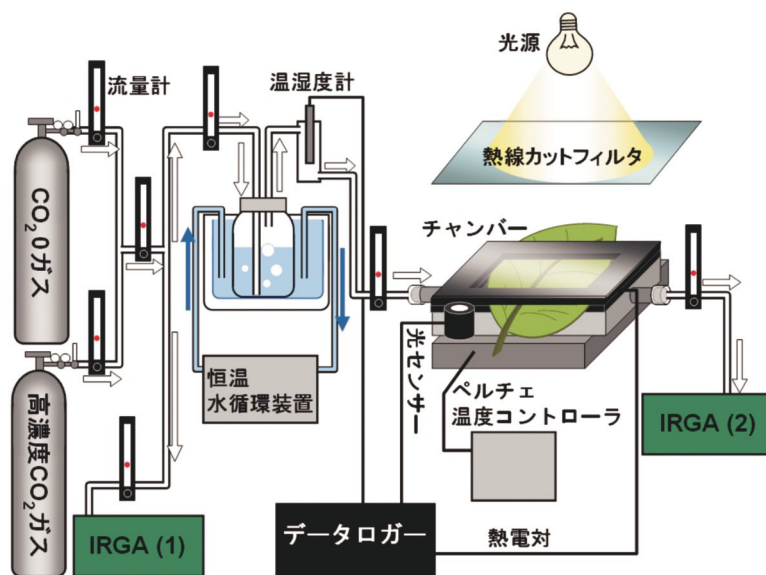


図 2: 個葉の光合成および暗呼吸速度、蒸散速度を測定する開放系システムの概略図。

認しチャンバーに送る。チャンバーへの流量は、チャンバーの容量に合わせて決めるが、概ね 0.5~1.0 l/min 程度である。チャンバーで空気のリークが生じることと、測定に用いる IRGA が適切なガス分析に要する最小流量 (0.5 l/min 程度) を考慮する。また流量が小さいと葉の境界層が発達して十分なガス交換が得られないため、チャンバーにファンを入れない場合には、流量が多い方が良い。一方で流量が多すぎると速度の低いガス交換を検知しにくくなるという問題も生じる。

2.a.2.2 チャンバーとその環境制御

チャンバーは、アクリルやガラス製の無色透明な窓の付いた上蓋（チャンバー上部）と、金属製の底面を持つ箱状の部品（チャンバー下部）から成る（図 3）。チャンバーの容量を大きくする場合には、葉面の境界層を薄くするためにチャンバー内にファンをつける。チャンバーの上部と下部の間に測定対象とする葉を挟む。このとき、

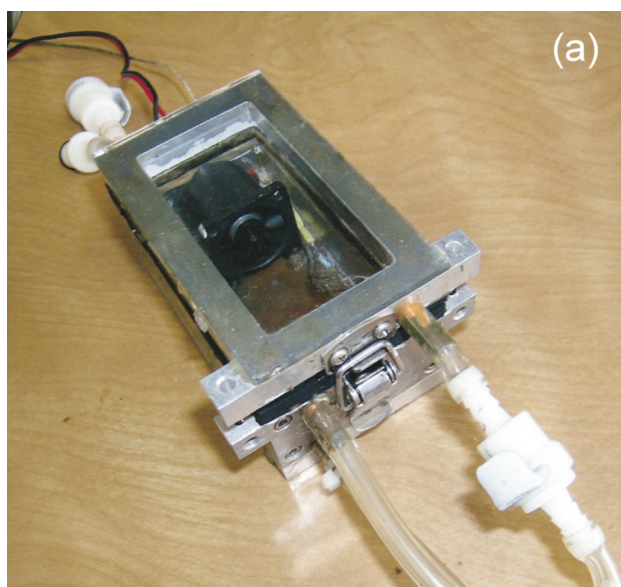


図 3：個葉のガス交換測定に用いるチャンバーの写真。容積が大きいためにファンを備えたもの (a) と、チャンバー内積を薄くしてファンを不要にしたもの (b)。(写真：a, 彦坂幸毅氏, b, 筆者)。

チャンバーと葉の隙間からの空気のリークと葉の損傷を防ぐために、密封性が高く、かつ柔らかい素材で枕をつける。ウェットスーツの生地が最も適している。

チャンバー内には、葉温と気温を測定するための熱電対を 1 本ずつ挿入する。これらの熱電対はデータロガーに接続する。

チャンバーの温度は、サーモモジュールによって行う。チャンバーの下部を金属製とし、サーモモジュールに直接取り付けることによって、効率よく温度制御をすることができる。ただし過度な冷却はチャンバー内での結露を生じるため、低温での測定を行う場合にはチャンバーに送る空気の温度を事前に下げることや、実験室温の制御を同時に行うことが有効である。

光合成速度の測定に供する光は、陽光ランプ（メタルハライドランプ）から得る。陽光ランプの光は熱を持つため、熱線カット用ガラスフィルタを用いて熱を遮断する。または、ハロゲンランプを用いた冷却装置付きの光源装置を用いる。チャンバーに照射する光強度の調節は、光質を変化させない寒冷紗（黒色あるいは白色）によって行う。葉の暗呼吸速度の測定を行う場合には、チャンバー全体を黒色の布などで完全に覆う。

2.a.2.3 分析系

チャンバーから出る空気（サンプルガス）は流量計を通して流量の確認を行い、IRGA に導入する（図 2 の IRGA-2）。チャンバーの前後で流量に大きな差がある場合には、チャンバーの密封性を上げる工夫を施す。

2.a.2.4 光合成速度の計算

光合成速度や暗呼吸速度の計算は、チャンバーに送られる空気の流量 (F)、2 つの IRGA で測定する CO_2 濃度 ($\text{CO}_{2\text{ref}}$ と $\text{CO}_{2\text{sample}}$)、チャンバー内の葉面積 (L)、光合成速度と同時に測定される蒸散速度 (E) の値を用いて行う。

開放系システムにおけるマスバランスは次式によって表される。

$$L \times A = F_{in} \times \text{CO}_{2in} - F_{out} \times \text{CO}_{2out} \quad (1)$$

ここで L はチャンバー内の葉面積、 A は求める光合成速度、 F_{in} はチャンバーに入るとき空気の流量 (mol s^{-1})、 F_{out} はチャンバーから出る空気の流量である。また CO_{2in} と CO_{2out} はそれぞれチャンバーに入る空気の CO_2 濃度 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) とチャンバーから出る空気の CO_2 濃度であり、前者は $\text{CO}_{2\text{ref}}$ と等しく、後者は $\text{CO}_{2\text{sample}}$ と等しい。流量計で測られる流量の単位は多くの場合は $[\text{l/min}]$ であるため、理想気体の状態方程式を用いてモル量に変換する⁵⁾。

チャンバーにリークが全く無ければ、チャンバーから出る空気の流量 F_{out} は、

$$F_{out} = F_{in} + L \times E \quad (2)$$

となる。式 (2) を式 (1) に代入して整理すると次式を得る。

$$A = \frac{F_{in}(CO_{2in} - CO_{2out})}{L} - E \times CO_{2out} \quad (3)$$

蒸散速度 (E) の計算方法については、3 章を参照されたい。

2.a.3 植物体の呼吸測定システム

筆者らは草本や小型の稚樹の器官（葉，茎，根）や個体の呼吸速度の温度依存性を測定することを目的として、開放系のガス交換測定システムを使用している（図 4）。呼吸速度は温度の影響を最も強く受けるため、測定時のチャンバー内の温度環境の制御が必要である。このシステムでは、チャンバーを水槽に沈め、水槽内の水温を恒温水循環装置を用いて調整することによってチャンバー内の温度を制御する。呼吸測定システムでも、上記の個葉ガス交換測定システムと同様に、①送風系、②同化箱系、③分析系、から成る。

2.a.3.1 送風系

筆者らは測定に供する空気は、一定濃度の CO_2 を含むエアバランス（窒素，酸素， CO_2 の混合）ガスボンベから得ることが多い。ガスボンベではなく外気を用いる場合には、空気の CO_2 濃度を可能な限り安定させるため

に、数 m^3 のビニル製のバルーンか大型のポリタンクにエアポンプで外気を導入し、そこから小型のポンプでガス交換システムに送風する。送風される空気の CO_2 濃度は常に測定される必要がある。

チャンバーへの送風量は流量計やマスフローコントローラーで調節する。流量は、チャンバーのサイズや植物試料の呼吸活性にもよるが、概ね $0.5 \sim 1.0 \text{ l/min}$ 程度である。呼吸活性が低い試料に対して流量を大きくすると、 CO_2 濃度の差を検出しにくくなるため、測定条件や試料の状態に応じた調節を必要とする。

チャンバーに送る空気の温度と湿度も、温湿度計を用いて測定する。温湿度計はデータロガーに接続し、チャンバー内の温度とともに記録する。

2.a.3.2 植物試料（サンプル）、チャンバーとその環境制御

筆者らが呼吸を測定する際には、適当な長さ（30 cm 程度）に切断した金属パイプの両端をゴム栓でふさいだものをチャンバーとして用いた。金属は温度の伝わりが良く、水に沈むので水槽に沈めるための工夫（重りをつけるなど）の必要がない。金属パイプの両端にはめるゴム栓にはコルクボーラーで穴を開け、チャンバーへの空気の供給（入口）と排出（出口）のそれぞれのためのチューブと、チャンバー内の温度を測定するための銅-コンスタンタンの熱電対を通した。

チャンバーの温度制御には、大型のプラスチック製コンテナと恒温水循環装置を用いている。コンテナに水を入れて水槽とし、チャンバーを水槽に沈め、水温を恒温水循環装置によって制御することにより、チャンバー

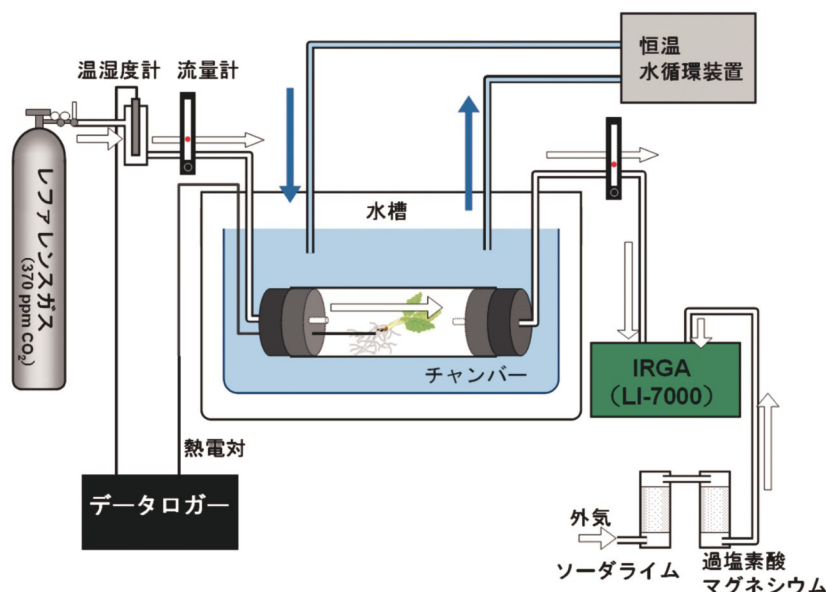


図4：植物体の呼吸速度を測定する開放系システムの概略図。

内の植物試料の温度を調節する。呼吸速度の温度依存性の測定には、概ね、5～40℃での制御ができることが望ましい。水槽の水温を変える際には、恒温水循環装置だけに頼らずに、水槽に湯や水を入れると時間の節約になる。

チャンバー内には熱電対を導入して、その先端を医療用の紙絆創膏などを用いて植物体に軽く止め、植物体の温度をモニタリングする。熱電対はデータロガーに接続し、記録する。

植物試料をチャンバーに入れる際には、測定中の乾燥を防ぐために濡れたキッチンペーパーで包む。さらにこれを目の粗く柔らかい金属製の網で軽く覆うことにより、植物体サンプルやキッチンペーパーがチャンバーの内壁に密着することを防ぐ。これによりチャンバー内の空気の循環がスムーズになるため、測定誤差を小さくすることができる。

2.a.3.3 分析系

チャンバーから排出される空気のCO₂濃度は、赤外線ガス分析計 (IRGA) で分析する。このシステムでは、LI-7000 (Li-Cor 社) を使用している。LI-7000 は二つのIRGAのセルを持つ。最も安定した測定を行うためには、一方のセルにはサンプルガス (チャンバーから排出される空気) を、他方のセルにはCO₂ およびH₂Oの濃度が一定のガスを流し、二つのセルに流れる空気のCO₂濃度差からサンプルガスのCO₂濃度を測定する方法を採ると良い。筆者らのシステムでは、ポンプで引いた外気をソーダライム、および過塩素酸マグネシウムの入った容器を通してCO₂、H₂Oを取り除き、その空気を分析時の基準濃度とした。

IRGAに水が入ると故障の原因になる。もし、測定の際にチャンバーからIRGAの間のチューブ内部に水滴が多量に着く場合には、チャンバーとIRGAの間に過塩素酸マグネシウムを入れた容器、あるいは冷却式エアードライヤーを着けてガスを通し、水分を取り除いた後に、IRGAにサンプルガスを送る。IRGAに送られる空気の流量は、流量計を用いてモニタリングする。

多くのIRGAには、測定値をデータロガーに出力するための外部接続端子が備えられているので、測定値はデータロガーに記録する。

2.a.3.4 測定中のその他の注意

呼吸によるCO₂濃度の変化は光合成による変化に比べて非常に低いことから、測定値のわずかな誤差が測定結果に大きく影響する。そのため、1～2時間ごとにIRGAの較正を行う。また、チャンバーにサンプルが入っていないくても、サンプルを包むキッチンペーパーが含む

水分やチューブ内の結露はCO₂を吸収してしまう。植物体サンプルが小さかったり、呼吸活性が低いサンプルの場合には、この吸収量は無視できない。そこで、測定の際にはサンプルをチャンバーに入れずに測定時と同じ条件 (室温、水温、ガスの流量) で標準ガスを流した際のCO₂濃度の変化も測定しておき、サンプルの呼吸以外の要因によるCO₂濃度の変化量を把握しておく。

チャンバー内の植物体の呼吸活性以外の要因がCO₂濃度の変化にもたらす影響を検出しやすくするためには、チャンバーを複数 (2～4個) 用意し、このとき少なくとも一つのチャンバーには植物試料を入れず、他と同様に湿らせたキッチンペーパーを入れて、並行して測定する方法がある。測定中にはこれらのチャンバーすべての同量の空気を流す。チャンバーから出るチューブは、それぞれ「三方コック」に接続する。各チャンバーのCO₂濃度を測定する際には、このコックを操作してIRGAに空気が送られるようにする。

室温とチャンバー内の設定温度によっては、チューブ内の結露は避けられないが、チューブ内に結露で水分が貯まってしまわないようにしなければいけない。そこで、結露したチューブは、ひとつの条件での測定を終える度に取り外し、エアポンプで外気を流して乾燥させるなどの工夫が必要である。

2.a.3.5 呼吸速度の計算

植物体の呼吸速度 (R) は、以下の式で求められる。

$$R = F \times \Delta CO_2 \div M \quad (4)$$

ここで、 F はチャンバーへ送る空気の流量 (mol s⁻¹)、 ΔCO_2 はチャンバーに送る空気とチャンバーから出る空気のCO₂濃度の差 (μmol mol⁻¹)、 M は植物体量 (葉面積、乾燥重量) である。流量計で測られる流量の単位は多くの場合は [l/min] であるため、理想気体の状態方程式を用いてモル量に変換する⁵⁾。

植物体の器官の呼吸速度を測定する際には、個体から切り離すことになる。しかし植物は傷害を受けると呼吸速度が上昇する^{6),7)}。そのため、筆者らは小型の多年生草本 (サクラソウ *Primula sieboldii*) を材料として、以下の手順によって、測定された呼吸速度から傷害による呼吸が占める割合を求めて、呼吸速度の測定値を補正した³⁾。

$$R_A = OR_A - (OR_A + OR_B - R_{IR}) \times \frac{OR_A}{OR_A + OR_B} \quad (5)$$

$$R_B = OR_B - (OR_A + OR_B - R_{IR}) \times \frac{OR_B}{OR_A + OR_B} \quad (6)$$

1) Intact な状態で植物個体全体の呼吸速度 (= R_{IR}) を測定する。

- 2) サンプル個体を地上部(葉と葉柄)および地下部(根)に切り分ける。カミソリで切り分け、乾燥を防ぐために切り口にワセリンを塗る。植物体の切り分け方は、材料とする植物の形態に応じる。
- 3) それぞれ、見かけ上の地上部の呼吸速度(= OR_A)と地下部の呼吸速度(= OR_B)を測定する。この値には傷害による呼吸速度も含まれるため、サクラソウの場合には OR_A と OR_B の合計は R_{IR} より 40%程度高くなっていた。
- 4) 見かけ上の呼吸速度は、それぞれ同じ割合で傷害による呼吸速度を含んでいると仮定し、実際の呼吸速度(= OR_A , OR_B)を推定した。

大型の植物体の一部を切り出して測定を行う場合には、試料を乾燥させないように保存状態に留意しながら、呼吸速度の時間経過を事前に把握しておくといよい⁸⁾。

2.a.4 その他の測定例

開放系のガス交換測定システムを自作することの最大のメリットは、チャンバーのサイズや計上の自由度の高さにある。すなわち、研究対象とする植物体の構造やサイズに応じてチャンバーを工夫することにより、比較的自由に研究を実行できる。例えば筆者らは、やはり小型の多年生草本(カワラノギク *Aster kantoensis*)の個体を納めることのできるチャンバーを開発し(図5)、地上部(葉、茎)と地下部(根)のそれぞれの光合成と呼吸速度を別々に、そして同時に測定した²⁾。植物の地下部はプラスチック製のポットに入れた砂(微生物呼吸の影響

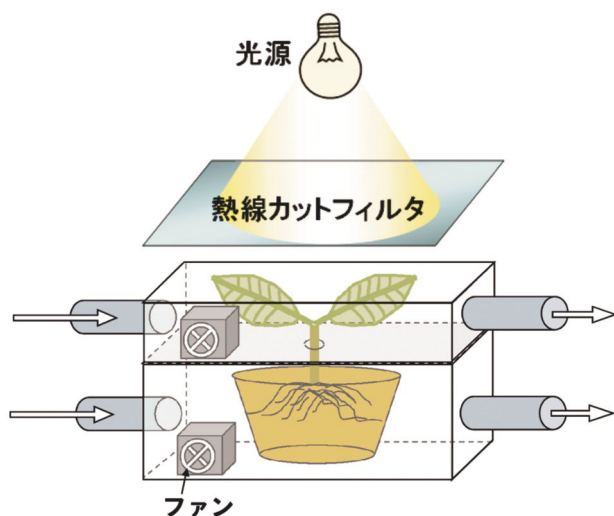


図5：開放系システムを用いて、植物個体の地上部(葉)と地下部(根)のそれぞれの CO_2 ガス交換速度を同時に測定する場合のチャンバー。このチャンバーを図2で示した水槽に沈めることによって、測定試料の温度制御を行う。

響を消すために、よく洗浄し、陽に乾した)に植えた状態で測定を行った。ただしこのチャンバーでは、チャンバー上部と下部の間で CO_2 の行き来がないように、パテで茎の周辺を密閉するなどの注意深い準備が必要である。さらに筆者らはこのチャンバー全体の密閉度を完全なものとして、先の要領で水槽に沈めて植物体全体の温度を制御することにより、光合成速度と呼吸速度の温度依存性を測定することができた。このようなチャンバーを使うことにより、植物体の地上部と地下部の光合成・呼吸活性の相互関係を調べることが可能になるだろう。なお葉の光合成速度を開放系システムで測定する際には、気孔閉鎖を防ぐために、チャンバーに流す空気湿度を適切に管理する必要がある。チャンバーに流入する空気と排出される空気の相対湿度を温湿度計で常にモニタリングする。気孔コンダクタンスや蒸散速度は、これらの測定値とチャンバー内の葉温、空気の流量から計算する⁵⁾。また光合成測定時には、人工光源(メタルハライドランプなど)を用意する。光源はチャンバーの上方に固定し、熱線を除去するガラスフィルタを間に設置する。葉に照射する光量の調節は寒冷紗などを用いる。

植物個体の CO_2 ガス交換の測定だけでなく、開放系システムを利用して、植物群落の CO_2 ガス交換を測定することも可能である。ただしこのようなシステムでは、流量を大きくすること、チャンバー内の空気の攪拌を十分に行うことが、信頼性の高い測定に必要である。筆者らは携帯型光合成測定装置(LI-6400)に自ら設計したアクリル製チャンバーを接続することにより、高緯度北極ツンドラ生態系において、小面積の群落の光合成と呼吸速度、すなわち生態系純生産量と生態系呼吸量の測定を試みている⁹⁾。

本稿で紹介した機器のメーカーおよび日本代理店の情報は以下の通りである。

タイテック株式会社

<http://www.taitec.ne.jp/index.html>

Li-Cor 社 <http://www.licor.com/>

(日本総代理店 メイワフォーシス株式会社

<http://www.meiwafoosis.com/index-1.htm>)

CID <http://www.cid-inc.com/index.html>

(日本代理店 ナモト貿易株式会社

<http://www.namoto.com/>)

Heinz Walz GmbH <http://www.walz.com/>

(日本代理店 ナモト貿易株式会社

<http://www.namoto.com/>)

ヴァイサラ <http://www.vaisala.co.jp/>

文献

- 1) D. Sims, R. W. Pearcy, *Plant, Cell and Environ.* **17** (1994), p.881
- 2) J. Matsumoto, H. Muraoka & I. Washitani, *Annals of Botany* **86** (2000) p.787
- 3) H. Noda, H. Muraoka, Y. Tang & I. Washitani, *Journal of Plant Research* **120** (2007) p.375
- 4) 村岡裕由, 「光と水と植物のかたち 植物生理生態学入門」, 文一総合出版, 2003, p.229
- 5) C. B. Field, J. T. Ball & J. A. Berry, *Plant Physiological Ecology -field methods and instruction-*, ed. R. W. Pearcy, J. Ehleringer, H. A. Mooney & P. W. Rundel, Chapman & Hall, p.209
- 6) T. B. Kinraide, L. F. Marek, *Plant Physiol.* **65** (1980), p. 409
- 7) L. Wadso, F. Gomez, I. Sjöholm, P. Roczuki, *Thermochim Acta* **422** (2004), p.89
- 8) T. Nakatsubo, Y. Bekku, A. Kume & H. Koizumi, *Polar Research* **17** (1998), p.53
- 9) H. Muraoka, M. Uchida, M. Mishio, T. Nakatsubo, H. Kanda & H. Koizumi, *Canadian Journal of Botany* **80** (2002) p.1193