

氏名	KEERTHI SRI SENARATHNA ATAPATHTHU
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学位記号番号	博理工甲第1000号
学位授与年月日	平成27年9月18日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	EFFECTS OF WATER TURBULENCE AND MEAN FLOW ON GROWTH, METABOLISM AND ULTRA-STRUCTURAL VARIATIONS IN AQUATIC MACROPHYTE; ELODEA NUTTALLII (水生植物コカナダモの生長、代謝、微細構造の変化における平均流動及び乱流成分の影響)
論文審査委員	委員長 教授 浅枝 隆 委員 教授 川合 真紀 委員 教授 金子 康子 委員 准教授 藤野 毅

## 論文の内容の要旨

An array of functions provided by aquatic plants is essential to maintain the ecological balance of aquatic ecosystems. Aquatic plants experience various disturbances in aquatic systems for two reasons: the highly dynamic nature of the systems and the sedentary nature of the plants. The productivity of the plants is highly dependent on environmental stresses and a wide range of fluctuations in specific abiotic factors. Among the abiotic factors, water movement is the most important for submersed aquatic plants because the flow driven drag and lift forces have either a positive or a negative effect depending on the magnitude. The mechanisms governing flow-plant interactions are not yet fully understood, and the plant response to main flow (without turbulence) against turbulence is largely unknown. Acquiring knowledge and clarifying the interactions between aquatic plants and environmental factors are important to understand how the functions of plants would benefit from the management of ecosystems. Although the stress responses of submersed plants to turbulence were reported previously, information on the plant responses to mean flow is scarce, to our knowledge. Further, effects of water movements on the architecture of plant cells and amino acid metabolism are yet to be explored. This study hypothesized that, the water movements significantly impact to the plant metabolism, stress response and the ultrastructure of plant cells. Therefore in this study, laboratory experiments and field investigations were carried out to study the metabolism, stress responses and ultra-structures of aquatic macrophytes in response to water movements.

In the first experiment, growth and stress responses of *Elodea nuttallii* exposed to either turbulence or main flow were compared to control plants grown in stagnant waters. Turbulence and main flow were generated using a vertically-oscillating horizontal grid and a recirculating system, respectively. At the end of the experiment after three weeks, growth, chlorophyll fluorescence, concentrations of indole acetic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, chlorophyll, cellulose, lignin and antioxidant enzyme activities of plants exposed to turbulence or main flow were compared with control plants. A

decrease in shoot elongation coupled with an increase in radial expansion was observed in plants exposed to turbulence and mean flow. The effects on the plants exposed to turbulence were further accompanied by significant increases in cellulose and lignin. Significant elevations in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidant enzyme activities were observed in turbulence-stressed plants, and the lowest stress was observed in control plants. The effects of main flow-induced stress were similar to characteristics of control plants. Turbulence reduced total chlorophyll by approximately 40% compared to plants in the control and main flow. Mechanical stress induced by turbulence leads to increased oxidative stress and tissue rigidification in *E. nuttallii* and that turbulence triggered stress is more severe than that induced by main flow.

The second experiment investigated growth, metabolism and ultra-structural changes in response to turbulence in aquatic macrophyte; *Elodea nuttallii*, after exposure to turbulence for 30 days. The turbulence was generated with a vertically oscillating horizontal grid. The turbulence reduced plant growth, plasmolyzed leaf cells and strengthened cell walls, and the plants exposed to turbulence accumulated starch granules in stem chloroplasts. The size of the starch granules increased with the magnitude of the turbulence. Using capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE-MS), an analysis of the metabolome found metabolite accumulation in response to the turbulence. Asparagine was the dominant amino acid that was concentrated in stressed plants, and organic acids such as citrate, ascorbate, oxalate and  $\gamma$ -Amino butyric acid (GABA) also accumulated in response to the turbulence.

The third trial was conducted to study the effect of mean flow on plant functioning and structure. *E. nuttallii* were exposed to flowing ( $\sim 10 \text{ cm s}^{-1}$ ) and stagnant waters for 30 days. At the end of the experiment, plant growth, chlorophyll and ultra-structural variations were compared. Final shoot length was not significantly different among two treatments while the plants grew in flowing waters consisted of comparatively longer internodes. Although the chlorophyll content of plants in the latter treatment was less than that of control group, the difference was insignificant. Electron microscopy observed thin, elongated chloroplasts in leaves of flowing treatments while, control plants with wide chloroplasts. Structure of leaf cells were affected by the water flow as the diameter of cells in control plants was bigger than that of flowing treatment. These results indicated that turbulence caused severe stress that affected plant growth, cell architecture and some metabolic functions of *E. nuttallii* than the mean flow.

A field investigation was conducted at Moto Arakawa, a tributary of the Arakawa River, Japan to study the consequences of turbulence induced stress response of aquatic macrophytes in natural condition. Six study sites were selected and the velocity fluctuations inside macrophytes stands were measured using a two dimensional electromagnetic current meter. Transects were significantly different ( $p < 0.05$ ) in terms of turbulence velocity. The location having the lowest turbulence was considered as the control turbulence. Plant stress responses to turbulence were compared by measuring the antioxidant activities (peroxidase, catalase and ascorbic Peroxidase), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and indole acetic acid (IAA). Antioxidant productions were significantly higher in plants exposed to higher magnitudes of turbulence compared to those grew in the control transect. Compared to control transect, an elevated level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and low concentration of IAA were also measured in plants grown in turbulent environments. Decrease in IAA content was detected in response to increasing turbulence. Lignin and cellulose accumulation were significantly higher in plants exposed to elevated level of turbulence compared to control plants. Taken together, field observations suggest that mechanical stress induced by turbulence led to increase oxidative stress and tissue rigidification in *M. spicatum* and the laboratory findings were in consistent with field observations.

Findings of this study revealed that turbulence make significant negative impacts to plant functioning and architecture, and the severity of the impacts increase with the magnitude of turbulence. Even though the effect of mean flow is stressful for aquatic plants, the impacts were small compared to that of turbulence. All together, present findings

demonstrates the importance of water movements to aquatic plants and provides insights to clarify the interactions between aquatic plants and water movements to the benefit of aquatic ecosystem management.

## 論文の審査結果の要旨

沈水植物は水質を保ち、様々な水生の小動物のハビタートやレフージを提供する等、河川の生態系を健全に保つ上で大きな働きをする。そのため、沈水植物の群落の再生は重要な課題である。水生植物には、流れ、土壌条件、栄養塩、光環境、紫外線、有害金属、水温等、様々な非生物的環境ストレスが働いている。ところが、それぞれの沈水植物の、こうしたストレスに対する耐性や応答については、十分明らかになっていないと断言は難しく、再生事業において、大きな障害になってきた。そのため、沈水植物の再生は経験に頼られ、理論的な技術は未だ確立されていない。植物体内にはストレスが働くと、その強度に応じて活性酸素（ROS）が発生され、この活性酸素による細胞破壊を防ぐために、活性酸素を減じる様々な酵素が生成されることが知られている。しかし、沈水植物に対するストレスとしての強度、平均流と乱流という流動の形態の違いによる差、陸上植物の機械的なストレス応答にみられるアミノ酸に対する影響、細胞の微細構造の変化等が、水生植物の流動ストレスに対する応答の中で生ずるかなど、ほとんど解明されていない。

本論文はこうした背景の下、日本各地に頻繁にみられる外来の沈水植物であるコカナダモを対象に、周囲の流動がコカナダモに及ぼすストレスの影響を調べている。ここで、流動は、一方向の引っ張り力として働く平均流とコカナダモを振動させる乱流成分に分けられる。本論文では、コカナダモに働くストレスを平均流によるもの及び乱流成分によるものに分けて、これらに対するストレス応答を別々に機構面から明らかにしている。

研究は大きく三つのタイプの室内実験と野外調査で構成されている。室内実験においては、以下のような工夫が行われている。まず、平均流の影響を調べる実験では、タンク内で、乱流の発生を抑えるために縮流した管路内に通水することで、平均流の卓越した水流を作成、その中でコカナダモの生長実験を行っている。また、乱流成分の影響把握においては、タンク内で上下に格子を振動させることにより平均流の存在しない格子乱流を作成、その下で、生長実験を行っている。また、それぞれの場合につき、比較対象になる、流れのない静止した条件で生長実験を行い、その結果と比較検討を行うことで、流動による影響をそれぞれ平均流によるものと乱流成分によるものに分けることに成功している。

実験Ⅰは、平均流を課した場、乱流を課した場でコカナダモの生長実験を行い、コカナダモの形態、生長速度を測定すると共に、皮層の厚さ、 $H_2O_2$ 、CAT 活性、APX 活性、IAAO 活性、セルロース、リグニン含有率等を測定している。

その結果、格子乱流下で生長させたものについては、 $H_2O_2$ 、CAT 活性、APX 活性、IAAO 活性等は有意に高くなり、一方、IAA 濃度は低下、さらに、セルロース、リグニン含有量も高くなることが示されている。一方、平均流下で生長させた個体では、流れのない条件で生長させたものとの間に大きな差がみられなかった。同様な結果はクロロフィル濃度、クロロフィル活性にもみられ、平均流下で生長させた個体では変化がないのに対し、乱流下で生長させた個体では、有意な低下がみられた。以上の結果から、コカナダモが流動から受ける影響について、平均流からは比較的小さいストレスしか受けないのに対し、乱流成分から大きなストレスを受けるという結論を導き出している。

次に、元荒川上流部で実際に生えている植物を採取、同時に流動測定をすることで、上記の室内実験で得られた結果を、現地においても実証することで普遍性を導いている。

実験Ⅱでは、2種類の強度の乱流下で生長させた個体において、電子顕微鏡を用いて細胞に及ぼされる影響の把握を行って、流動のない条件で成長させたものとの間の比較、検討を行っている。生長速度は、流動のない条件で最も大きく、それぞれの細胞の長さにおいても同様に、乱流強度の大きい中で生長したものの

細胞の方が長くなっている。また、乱流強度の増加とともに、葉緑体が破壊されたり、細胞質が細胞膜から剥離したりすることで、葉の色が黄色に変色している。さらに、乱流強度が大きくなると、細胞膜が厚くなり、葉緑体内へのデンプンの蓄積量の増加すること等が示されている。また、形態的な変化の他にも、乱流強度が増加するほどアミノ酸の量が多くなること、また、その中でもアスパラギンや GABA、アスコルビン酸の量が増加し、アスパラギン酸の量が減少することが示されている。

実験 III では、平均流速の異なる中で、生長量、節の長さ、電子顕微鏡による細胞の微細構造の変化、アミノ酸等の変化について明らかにしている。平均流速が変化することで、全体の生長量は変化しないものの、節の長さが増大すること等が示されている。しかし、平均流による影響は乱流による影響に比べて極めて小さいことが示されている。

以上のような結果から、流動の中でも乱流成分がストレスとして働くこと、その影響は活性酸素の発生を促すだけでなく、生長ホルモンの生成等にも影響すること、また、細胞の形態に変化を与え、さらに、葉緑体の破壊や葉緑体へのデンプンの蓄積、アミノ酸含有量を変化させること等が結論されている。

論文の構成は、第一章の序論で、研究の目的を記述し、第 2 章で過去の研究のレビュー、第 3 章の 3.1 で実験 I についての実験の説明及び野外観測の結果、3.2 で実験 II の方法、3.3 で実験 III の方法を記述した後、第 4 章でそれぞれの結果についての記述、さらに、第 5 章で、それぞれの実験結果を踏まえた考察がなされている。