

ヤナギ属における木部の通水経路の解析方法の改良に関する研究

相, 衍

<https://hdl.handle.net/2324/7329533>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士（農学）, 課程博士
バージョン :
権利関係 :



ヤナギ属における木部の通水経路の解析方法の改良に関する研究

相 衍

2 0 2 4

目次

第一章 緒言	…1
1.1 はじめに	…1
1.2 これまでの研究と問題点	…1
1.3 本論文の目的	…6
第二章 オノエヤナギにおける樹幹と当年根の横断面からの通水ネットワークの差異の解明	…8
2.1 研究背景	…8
2.2 試料と方法	…9
2.2.1 供試木の育成と準備	…9
2.2.2 染料注入とサンプル採取	…10
2.2.3 木部の染料分布の観察	…13
2.2.4 理論的な水力伝導率	…13
2.2.5 統計分析	…14
2.2.6 水分分布の観察	…14
2.3 結果	…15
2.3.1 木部の染料分布	…15
2.3.2 木部の水分分布	…21
2.3.3 木部の染料分布と水分分布の関係	…21
2.3.4 通水効率	…24

2.4 考察	…28
2.4.1 木部の通水経路	…28
2.4.2 通水効率	…31
2.5 小括	…33
第三章 オノエヤナギにおける液体窒素で凍結した H_2^{18}O トレーサーを用いた ラベルサンプルの同位体濃度解析	…34
3.1 研究背景	…34
3.2 試料と方法	…38
3.2.1 供試木の育成と準備	…38
3.2.2 重水トレーサー導入とサンプル採取	…41
3.2.3 凍結湿組織試料の保存と採取装置	…43
3.2.4 凍結湿組織試料のスズカプセル封入法	…45
3.2.5 乾燥組織試料および液体サンプルの封入	…46
3.2.6 酸素同位体の分析およびデータ計算	…47
3.2.7 統計解析	…49
3.3 結果	…49
3.3.1 樹木の形態	…49
3.3.2 封入した凍結湿組織試料の水分損失率	…50
3.3.3 樹軸方向の H_2^{18}O 濃度分布	…52
3.3.4 H_2^{18}O トレーサーで置換された組織水の割合	…54
3.4 考察	…56

3.4.1 安定同位体導入および分析方法	…56
3.4.2 同位体分析	…59
3.5 小括	…61
第4章 総合考察	…63
4.1 今までの染料トレーサー注入法の評価	…63
4.2 今後染料トレーサー注入法の利用展望	…65
4.3 現段階の安定同位体トレーサー導入法の評価	…66
4.4 今後の染料トレーサー注入法の利用展望	…68
謝辞	…70
引用文献	…71

用語集

湿組織 木材は樹木の幹や枝から切り出されると、その内部には水分が含まれている。この水分が存在する木材組織を「湿組織」と呼ぶ。

凍結湿組織 木材組織内の水分が液体窒素で凍結している状態を指す。

組織水 木材組織内部に含まれる水分で、特に木材の細胞や組織に保持されている水のことを指す。

スズカプセル封入法 特定の化学物質をスズ製のカプセル内に封じ込める技術である。この方法は、主に化学分析や同位体トレーサー技術において、試料の分解、保存、または分析精度を向上させるために用いられる。

重水 通常の水 (H_2O) の水素原子または酸素原子の一部または全部が、重水素 (D) と重酸素 (^{18}O) の同位体で置き換わった水のことを指す。重水素重水の化学式は D_2O であり、重酸素重水の化学式は H_2^{18}O である。

メモリー効果 前に分析された試料の残留物や分解生成物が、その後に分析される試料に影響を与える現象のことを指す。

第一章 緒言

1.1 はじめに

樹木が蒸散を行う際、土壌から根に吸収された水は樹幹の木部を經由し、最終的には葉の気孔から大気中に放出される。樹木の水移動は、陸域水循環の重要な一部である (Calder, 1998; Berkelhammer et al., 2013; Levia et al., 2020)。また、樹木は蒸散によって大気中に水分を補給することで、地域の降水にも関与している (Schlesinger and Jasechko, 2014; Evaristo et al., 2015; Good et al., 2015; Ellison et al., 2017)。これまで樹木内の水移動に関する研究が様々な手法を用いて、行われてきた。その中で染料をトレーサーとして樹幹の一部を切断あるいは穿孔し、樹幹の破壊した部位から導入する手法により年輪レベルから組織・細胞レベルまでの通水経路が詳細に検討されてきた (Ellmore and Ewers, 1986, Umebayashi et al., 2008, Kitin et al., 2010)。しかし、従来の染料注入法では樹幹の切断や樹幹への穿孔により、木部の通水経路が破壊され、蒸散時には負圧となっている通水経路の圧力 (Sano et al., 2005) が大気圧に近づくことで、実際の生きている樹木の水移動を完全には把握できていない可能性があると考えられた。

1.2 これまでの研究と問題点

樹木は根を通じて土壌から水を吸収し、樹幹木部を經由して葉へと輸送し、主に葉の気孔を介して空気中に蒸散する重要な役割を担っている (Sperry et al. 1998, Buckley 2019, Walthert et al. 2021)。この知識は

ほぼ 20 世紀初頭に確立され、植物生理学や生態水文学モデルの基盤をなしている (Gates 1914, Arisz 1956, Lambers et al. 2019, Coccozza and Penna, 2022)。樹木個体内の水は根から木部を経由して葉まで水ポテンシャルの勾配によって移動する (Boyer, 1968; Hsiao, 1973, Choné et al., 2001)。温帯地域では、水ポテンシャルは夏に低下し、冬には上昇する (McCutchan and Shackel, 1992; Lansac et al., 1994)。また日変動も見られる (Klepper, 1968; Jarvis, 1976; Biscoe et al., 1976; Caldwell et al., 1998)。さらに、樹木の水ポテンシャルが低下すると樹液の流速が増加し、その逆もまた生じることも既往の研究で報告されている (Ikeda and Ohtsu, 1992, Nadezhdina, 1999, Ortuño et al., 2006)。

樹木の木部には仮道管、道管要素、周囲仮道管、繊維状仮道管、柔細胞などの通水要素が存在している (Umebayashi et al., 2007, 2008, 2010; Sano et al., 2011; Pfautsch et al., 2015)。しかし、木部の通水経路は樹種によって異なっている (Frost, 1930, 1931; Bailey, 1944; Tyree and Zimmermann, 2002; Olson et al., 2020)。また、木部のすべての通水要素が長期間にわたって通水機能を維持するわけではないと考えられている (Utsumi et al., 1998, 1999)。広葉樹において、通水経路は横断面上の道管の配置によって異なっている。環孔材の樹種では、最外年輪の大きな孔圏道管と同一年輪内の樹皮側の小さな晩材道管が通水機能を持っている (Ellmore and Ewers, 1986; Umebayashi et al., 2008)。散孔材の樹種では、木部の樹皮側の複数年輪の道管を通じて水輸送が行われていることが報告されている (Kozlowski and Winget, 1963; Umebayashi et al., 2007)。

樹木個体内の水移動と水分布などの通水ネットワークについて研究することは、樹木の水力学特性の理解には不可欠であると考えられている (Bazzaz, 1979; Wullschlegel et al., 1998; Meinzer et al., 2001; Hammond et al., 2019)。これまでにトレーサー注入法 (Meinzer et al. 2001, Sano et al. 2005, Jacobsen and Pratt 2012; Orlowski et al. 2023)、樹液流測定 (Granier 1987, Smith and Allen 1996, Poyatos et al. 2016)、コンピュータ断層撮影 (Tognetti et al. 1996, Fromm et al. 2001, Brodersen et al. 2010) などの様々な手法が樹木の水力学特性を解明するために効果的に利用されてきた。最近の研究技術の進歩や手法の改良により、樹木の水力学特性に関する理解の精度と深度が大幅に向上した (Bouda et al. 2019, Kagawa 2022, Xiang et al. 2023)。

19 世紀半ば以降、樹木の幹の切断や穿孔による染料を注入する方法が木部の組織や細胞レベルでの通水経路を解明するために使用されてきた (Caspary 1862; Strasburger 1891; 1893; Arndt, 1929; Baker and James, 1933; Roach, 1939; Chaney and Kozlowski, 1977; Hinckley et al., 1978; Ellmore and Ewers, 1986)。染料注入法は多くの樹種で通水経路を分析するために適用されている (Umebayashi et al., 2007, 2008, 2010; Kitin et al., 2010; Jacobsen and Pratt, 2012; Pratt and Jacobsen, 2018; Wason et al., 2019; Ganthaler and Mayr., 2021)。既往の研究では、木部の染色された道管が通水機能を持つことが指摘されている (Umebayashi et al., 2010, Kitin et al., 2010)。しかし、従来の染料トレーサー注入法では、樹幹を切断または穿孔して染料を注入する方法が採用されてきた (Sano et al., 2005; Umebayashi et

al., 2007, 2008, 2010)。しかしこの方法では、顕著な問題点が存在している。第一に、樹木に物理的損傷を与えてから染料を注入するこの方法は、通水経路の切断により生きている樹木の生理状態が変化する可能性があり、特に樹木内の圧力が負圧から大気圧に変わる (Sano et al., 2005) ことで、切断した樹幹木部の横断面から吸収した染料トレーサーを外側から内側の複数年輪に経由し、移動範囲が大きくなり、実験結果の妥当性に影響を及ぼす恐れがあると考えられる。さらに、樹幹から染料トレーサーを導入する方法は根系が樹木の水吸収と輸送に果たす役割を無視しているため、根系の重要性が過小評価されてきた可能性があると考えられる。従来の染料注入法では樹幹内部の複数年輪の通水機能が過大評価され、根系が樹木の水吸収と輸送に対する重要性も十分に評価されていない危険性がある。

また、樹木の木部の通水能力を定量的に評価するために、道管の通水効率の測定が既往の研究中に広く用いられている (Sperry et al., 1988; Nonami and Boyer, 1990; Yang and Tyree, 1992; Atkinson et al., 2003; Rosner et al., 2019)。この方法では、両端が切断された幹を使用し、木部の水が満たされたすべての道管が通水能力を持つと仮定している (Ellmore and Ewers, 1985; Sherwin et al., 1998; Lens et al., 2011; Melcher et al., 2012; Munitz et al., 2018)。しかし、樹木は複雑な通水ネットワークを持ち (Tyree and Zimmermann, 2002)、樹幹内の水は最外年輪だけでなく内側の年輪にも通水機能があるけど (Umebayashi et al., 2008, 2010)、樹齢の増加に伴い内側の木部の水で満たされた道管でも通水機能をもっていない可能性もあると考えられている (Kitin et al., 2010)。また、道管間の相互壁孔も放射方向の水

の輸送経路として機能している (Murakami et al., 1999; Fujii et al., 2001; Sano et al., 2008; Brodersen et al., 2011; Słupianek et al., 2021)。さらに、ハーゲン・ポアズイユの定義 (Hirose et al., 2005) に従って、直径が非常に小さい壁孔の通水効率が非常に低いため、放射方向へ大量の水を輸送することは困難であることが報告されている (Kitin et al., 2004, Fonti et al., 2010)。以上のような既往研究からは、樹皮側から髄側の木部への放射方向の水移動を十分に評価されていない恐れがあると考えられる。

染料トレーサー導入法以外に、従来の研究では、放射性同位体トレーサー (Stout and Hoagland, 1939; Scholander et al., 1955; Postlethwait and Rogers, 1958) を使用して、樹木個体内の通水経路を解明してきた。しかし、放射性同位体は人間に対して危険性が高いという欠点があり、一般的な研究では使うことが難しかった。近年、樹木の水力学特性を研究する方法として ^2H と ^{18}O などの人間に対して危険性がない安定同位体を利用した研究が増加している (Dawson et al. 2002; Álvarez - Cansino et al. 2010; Zhao et al. 2016; Treydte et al. 2021)。近年の多くの研究が樹木から吸収した安定同位体の濃度に根系、樹幹、葉などの部位による差を認めている (Barbour et al. 2017, Von Freyberg et al. 2020, Treydte et al. 2021)。また、樹木周囲の土壌中の安定同位体の存在種類と樹木個体内安定同位体の存在種類が同じであったことが示されている (Dawson and Ehleringer 1991; Yao et al. 2023)。さらに、最新の研究では安定同位体トレーサーを使用して樹木個体内の水移動を追跡する方法が有効であることが報告されている (Treydte et al. 2021; Kagawa, 2022)。しかしながら、これらの安定同位体トレーサー導入法においてトレー

サーの導入時間が長すぎるとトレーサーが拡散してしまい、樹体内での正確な水移動の解析が困難になるなどの問題点がある (Treydte et al. 2021; Kagawa, 2022)。また、安定同位体トレーサーを導入したサンプルの採取過程でトレーサーが固定処理されずに蒸発してしまうという問題点も指摘されている (Treydte et al. 2021; Seeger and Weiler 2023)。さらに、Kagawa (2022) による安定同位体トレーサー導入法による研究において、木材湿組織サンプルのスズカプセル封入技術が不十分であるため、多くのサンプルで封入したスズカプセルから組織水がリークし、実験の成功率が低くなり、実験結果の信頼性にも影響を与えたことが報告されている。

1.3 本論文の目的

上記の検討を踏まえて第二章では、生長が早く、成木から取った枝で苗木を水耕栽培でクローンできるオノエヤナギをサンプルとして用いた。そこで、水耕栽培で育成したオノエヤナギの苗木の幹の基部を切断したサンプルと当年根を切断したサンプルとの間で、染料トレーサー注入によって可視化された通水経路の相違を評価した。さらに、幹を切断したサンプルと当年根を切断したサンプルの横断面における水分分布と通水効率の差異を評価した。

第三章では、水耕栽培で育成した当年生の根、幹、葉だけで構成された当年生のオノエヤナギの苗木をサンプルとして用いて、水と同じ特性を示しながら水と区別して解析が可能な重酸素重水 (H_2^{18}O) をトレーサーとしてサンプルに導入した。樹木は破壊処理を行わずに同位体トレーサーを導入し、短期間の同位体トレーサー導入法の実用性を評価した。さらに、凍結湿組織サンプルを封

入する新しい方法を考案し、生きている樹木の通水経路を解析する実験の成功率を向上させた。

第二章 オノエヤナギにおける樹幹と当年根の横断面からの通水ネットワークの差異の解明

2.1 研究背景

従来の染料トレーサーを用いた研究は、木部の染色された道管が通水機能を持っていることを示唆している (Umebayashi et al., 2010; Sano et al., 2011; Kudo et al., 2018)。しかし、樹液流センサーでの計測結果によると、樹皮側の木部の樹液流速度が髄側の木部よりも高かったことが報告されている (Raschi et al. 1995; Tognetti et al. 1996; Zhang et al. 2015)。さらに、亜寒帯や温帯地域で育つ樹木の木部には複数年輪があり、根系から吸収した水は外側の年輪と放射系組織を経由し、樹幹内側の木部の年輪に移動したため、内側の年輪は当年の根や葉と直接つながっていなかった (Kitin et al., 2010; Pfautsch et al., 2015)。当年根の木部で吸収された水は年輪境界を超えて内側の年輪へ向かって放射方向に移動する際、年輪境界付近の道管間に存在する壁孔の径が非常に小さいため、ハーゲン・ポアズイユの法則に従うと、年輪境界を超えた放射方向の水移動に強い通水抵抗が生じる可能性がある。したがって、従来の染料注入法は、樹幹を切断や穿孔し、複数年輪から染料を導入することから樹幹木部の内側複数年輪に観察される染料トレーサーを通水機能を有していると過大評価し、樹皮側から髄側の木部への放射方向の水移動を正確に評価できてない可能性がある。

樹齢別の根から葉までの通水経路や通水効率を解明する研究は少ない。その理由としては、根系全体の年齢を特定することが困難であるためだと考えられ

る。そこで本章では、水耕栽培で無性繁殖により、樹幹に複数年輪を有し、当年根があるオノエヤナギを育成し、研究材料とすることを検討した (Carlson, 1938)。当年の不定根は、幹の切断部の根原基から形成されている (Beeckman, 2009; Bellini et al., 2014)。本研究の目的としては、まず、水耕栽培のオノエヤナギをモデル植物として使用し、染料注入法を用いて、当年根から葉への通水経路を観察し、幹全体を切断したサンプルと当年根を切断したサンプルの放射方向の水移動の違いを比較した。さらに、幹を切断したサンプルと当年根を切断したサンプルの水分布と通水効率の差異を評価した。

2.2 試料と方法

2.2.1 供試木の育成と準備

3 年輪を持つオノエヤナギの枝は、九州大学農学部附属演習林北海道演習林（以下、北海道演習林）（北緯 43° 15′，東経 143° 33′，標高 180-200m, 北海道足寄町）内の川沿いで採取し、北海道演習林構内に水耕栽培で供試木を生育した。30cm 長さの枝サンプル 6 本を 2017 年 4 月末に採取した（図 2-1a）。枝の下部 10cm をハイポネックス（HYPONeX JAPAN CORP., LTD., 日本）水溶液に 1 ヶ月間浸し、枝の基部から当年の不定根とシュートを発達させた（図 2-1b）。その後、サンプルをバーミキュライト入りのポットに移植し、毎日灌水した（図 2-1c）。サンプルは 9 月末まで育成され、本実験の前に当年根は水道水で洗浄された（図 2-1d）。

2.2.2 染料注入とサンプル採取

染料注入実験は2017年9月末の晴れた日の午前11:30から12:00に実施した。3つのサンプルは幹の基部を水中で切断し、他の3つのサンプルは当年根の基部を水中で切断した(図2-1e, f)。幹を切断したサンプル(当年根なしの幹、図2-2)と当年根を切断したサンプル(当年根あるの幹、図2-2)は、切断処理後すぐに0.2%酸性フクシン水溶液に浸した。酸性フクシン水溶液は実験開始前に0.22 μ m フィルター(GV, Millipore, USA)でろ過した(Sano et al., 2005)。蒸散によって染料トレーサーである酸性フクシンは切断面の吸収部位から頂端の葉まで移動した(図2-1g)。30分間染料トレーサーを注入した後に、各サンプルは、液体窒素に2分間浸漬した。凍結されたサンプルは-80°Cの冷凍庫に保存した。

凍結した幹から直径が1.5~2 cm、高さが約2 cmの円板を染料注入部から上方5 cm、10 cm、15 cmで採取した(図2-2)。5 cmと15 cm高の円板サンプルは凍結乾燥を行い(FDU-2200, EYELA, 日本)、染料分布観察実験に用いた。10 cm高のサンプルはそのまま-80°Cの冷凍庫に保存し、水分分布観察実験中に使用した。



図 2-1. サンプル育成と準備の画像。(a) 2017 年 4 月末に採取されたオノエヤナギの枝。(b) 枝の基部から発達した当年生の不定根。(c) サンプルを鉢に移植した状態。(d) 水に浸された当年根を発達したサンプル。(e) 切断処理をする前の当年根。(f) 切断処理した後の当年根（赤い枠内）、および同じ高さでの切断処理の幹部位。(g) 30 分間の染料注入後に染色された頂端の葉。

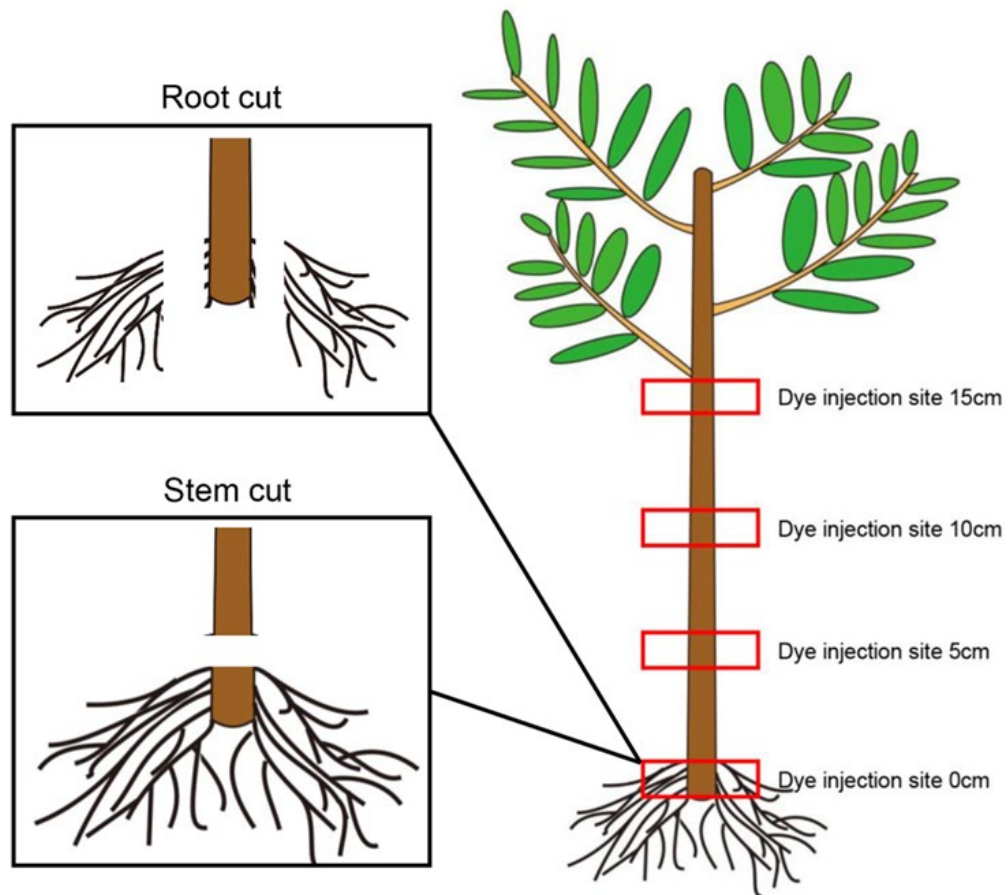


図 2-2. 幹を切断したサンプルと当年根を切断したサンプルの試料採取位置の画像。0cm の高さで染料を注入。5cm と 15cm 高のサンプルは染料分布を観察した。10cm 高のサンプルは水分分布を観察した。

2.2.3 木部の染料分布の観察

各サンプルから採取した 5cm および 15cm 高の凍結乾燥した円板から樹皮から髄までのブロック 3 つを得た。各ブロックの横断面はスライディングミクロトーム (REM-7000, ヤマト光機, 日本) で整形され、実体顕微鏡 (SZM-B-LED, AS ONE Corporation, 日本) に取り付けられたデジタルカメラで撮像した。

実体顕微鏡で各ブロックを観察した後に、道管内の染料の拡散を防止するため、全てのブロックはエポキシ樹脂を使って、包埋を行った (Sano et al., 2005)。スライディングミクロトーム (REM-7000, ヤマト, 日本) を使用して、各ブロックから 10 μ m の厚さの横断面切片を得た。染料分布は、光学顕微鏡 (Eclipse E600, ニコン, 日本) に取り付けられたデジタルカメラを使用して細胞レベルの観察を実施した。

本研究では、年輪内の道管配列を Umebayashi et al., (2008) に従って定義し、年輪内に最初に形成された半分の領域を早材とし、残りの半分の領域を晩材として記述した。

2.2.4 理論的な水力伝導率

全ての切片から年輪ごとの光学顕微鏡像を撮影し、画像解析ソフトウェア ImageJ (1.52k, <https://imagej.nih.gov/ij/>) を使用し、光学顕微鏡像を処理した。各画像で、同一年輪内の上下の年輪境界に接触する面積の測定範囲 (0.6 mm²) とした。測定範囲内の 30 個以上の孤立道管を選択し内腔の長径と短径を測定した (Scholz et al., 2013)。その後、道管内腔の平均直径および平均道管面積 (楕円の面積を計算する式) を算出した。道管の平均直径を計算

する式は以下の通りである：

$$d = \left(\frac{2a^3b^3}{a^2+b^2} \right)^{\frac{1}{4}}$$

ここで、a は孤立道管内腔の短径 (m)、b は孤立道管内腔の長径 (m)、d は孤立道管内腔の直径 (m) である (Lewis and Boose, 1995)。

道管の理論的通水効率、ハーゲン・ポアズイユの法則 (Tyree and Zimmermann, 2002) に基づいて以下のように計算された：

$$K_n = \frac{d^4 \pi \rho}{128 \eta_w}$$

ここで、d は孤立道管内腔の直径 (m)、 ρ は 25°C での水の密度 ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)、 η_w は水の粘度 ($\text{MPa} \cdot \text{s}$)、 K_n は道管の理論的通水効率 ($\text{kg} \cdot \text{m} \cdot \text{MPa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; Hirose et al., 2005) である。

2.2.5 統計解析

当年根切断および幹切断処理間の統計的差異は、SPSS 27.0 ソフトウェアパッケージ (SPSS 27.0, SPSS Institute Ltd., USA) を使用し、独立標本 t 検定により、有意水準 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 、および $p < 0.0001$ で決定した。Duncan 多重範囲検定は、当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの年輪ごとの統計的差異を比較するため、実施した。有意水準 $p < 0.05$ とした。また、Origin 2021 ソフトウェア (OriginLab Corporation, USA) で統計分析の図を作成した。

2.2.6 水分分布の観察

約 2cm の厚さの円板が全てのサンプルの 10 cm 高の部位から採取された。円

板の横断面はクライオスタットミクロトーム（POLAR-D, サクラファインテック, 日本）を使用して整形され、液体窒素で冷却した状態で低温走査電子顕微鏡（cryo-SEM）システム（JSM-IT200, JEOL, 日本）に移送された（Utsumi et al., 1998, 1999, 2003; Umebayashi et al., 2010; Yazaki et al., 2019）。道管内の水分布は 15 kV で観察した。

2.3 結果

2.3.1 木部の染料分布

当年根を切断したサンプルの染料注入部より 5cm および 15cm 高の部位で採取した試料の年輪ごとの横断面光学顕微鏡像と実体顕微鏡像では、導入した染料は最外年輪の晩材および最外年輪と樹皮から 2 年輪目の年輪境界に分布したが、樹皮から 3 年輪目では染料分布が観察されなかった（図 2-3a, c, e）。幹を切断したサンプルの染料注入部より 5cm および 15cm 高の部位で採取した試料では、導入した染料は最外 2 年輪の晩材および樹皮から 2 年輪目と 3 年輪目の年輪境界に分布した（図 2-3b, d, f）。

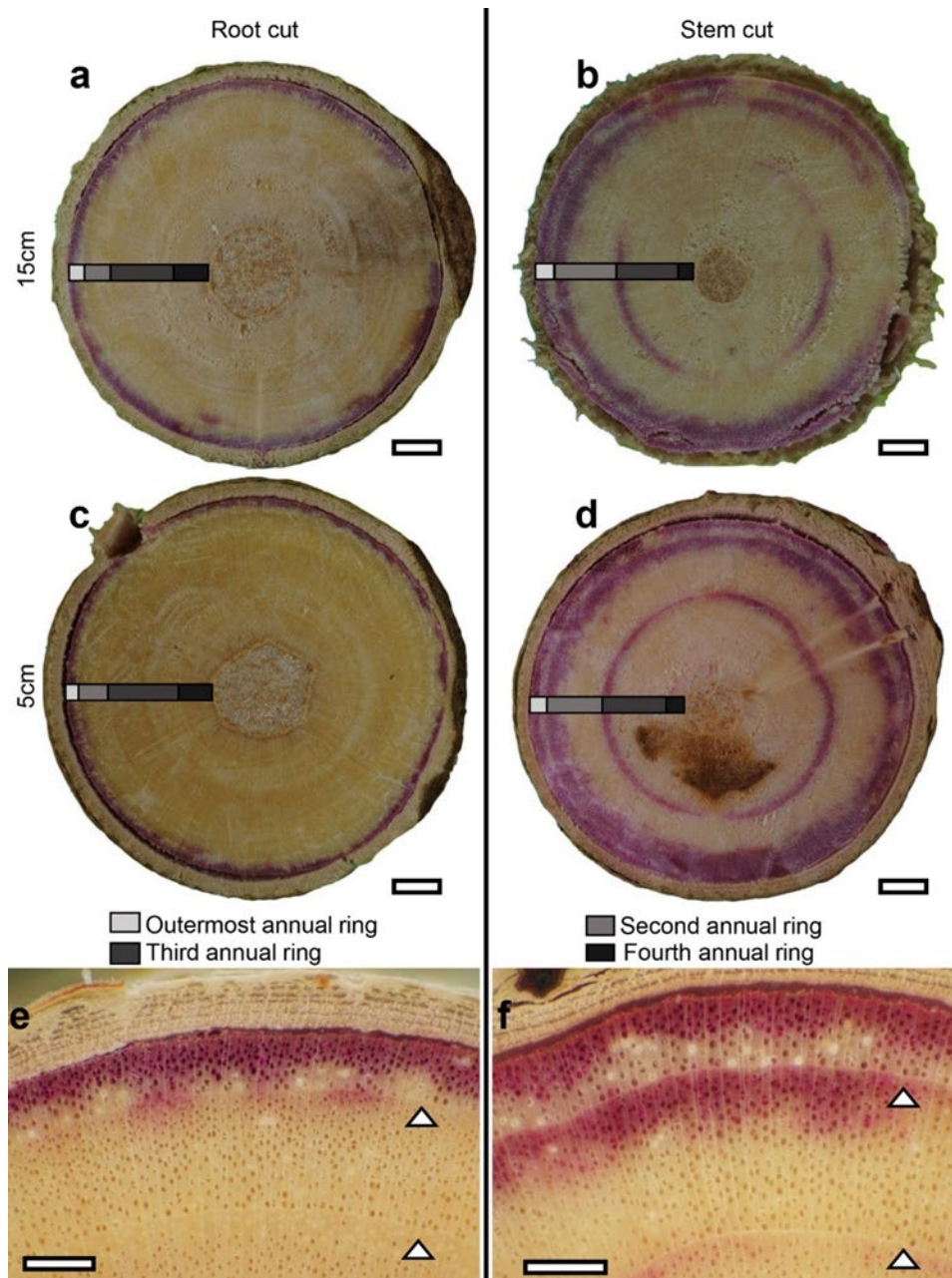


図 2-3. 当年根を切断した試料 (a, 15cm 高; c, 5cm 高) と幹を切断した試料 (b, 15cm 高; d, 5cm 高) の横断面の実体顕微鏡像。スケールバー: 3mm。e, f は当年根と幹を切断したサンプルの最外三年輪の横断面の実体顕微鏡像。(e) 当年根を切断したサンプルの最外三年輪の染色された木部。(f) 幹を切断したサンプルの最外三年輪の染色された木部。矢印: 年輪境界。スケールバー: 1mm。

当年根を切断したサンプルの染料注入部より 5cm および 15cm 高の部位で採取した試料では、光学顕微鏡像が示すように、染料は最外年輪の大径道管の内腔が染色された（図 2-4a）。しかし、樹皮から 2 年輪目（図 2-4b）および 3 年輪目（図 2-4c）の大径道管の内腔には染料の分布が認められなかった。幹を切断した個体では、各年輪の光学顕微鏡像が示すように、染料は最外 3 年輪の大径道管の内腔に染色が認められた（図 2-4d-f）。

当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの 5cm（図 2-5a）および 15cm（図 2-5b）高の試料の染色された道管の平均面積を比較したところ、最外年輪では、当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプル間で染色された道管の平均面積に有意差が認められなかった（図 2-5a, b）。しかし、2 年輪目および 3 年輪目では、当年根を切断したサンプルの染色道管の平均面積は幹を切断したサンプルの染色道管面積より有意に小さかった（図 2-5a, b）。

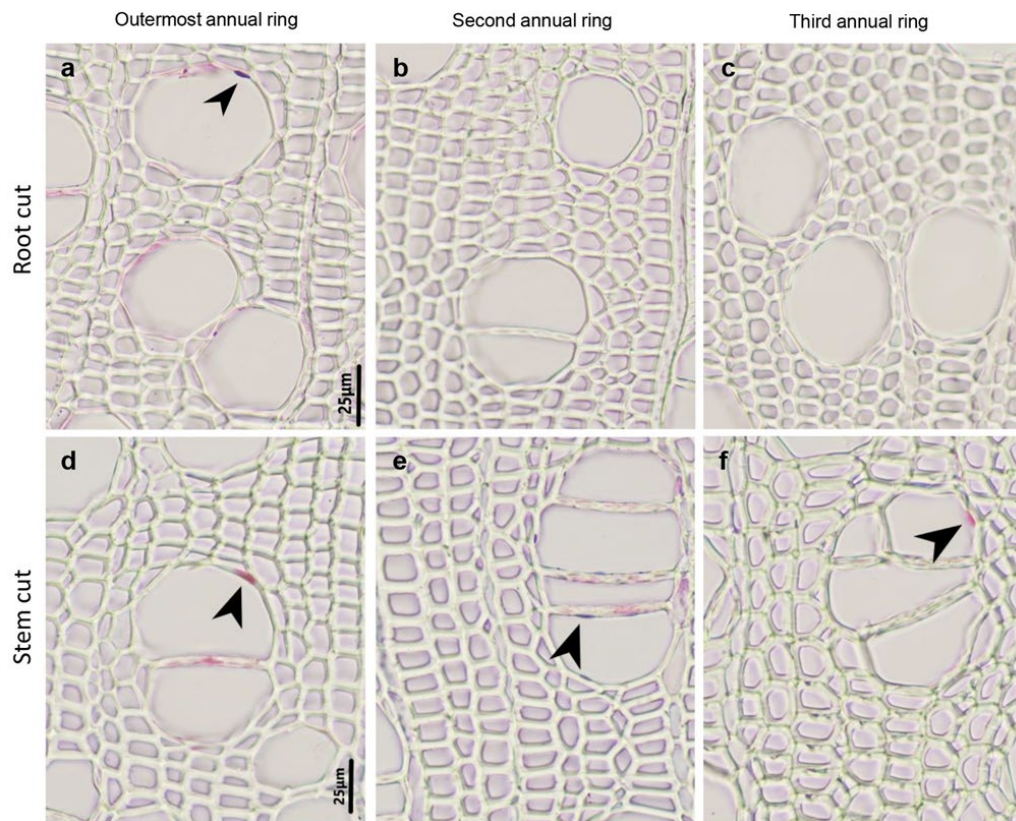


図 2-4. 当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの最外 3 年輪の大径道管の横断面光学顕微鏡像。(a) 当年根を切断したサンプルの最外年輪の道管。(b) 当年根を切断したサンプルの樹皮から 2 年輪目の道管。(c) 当年根を切断したサンプルの樹皮から 3 年輪目の道管。(d) 幹を切断したサンプルの最外年輪の道管。(e) 幹を切断したサンプルの 2 年輪目の道管。(f) 幹を切断したサンプルの 3 年輪目の道管。矢印：染色された道管。スケールバー：25 μm 。

染料注入部から 5cm (図 2-5c) および 15cm (図 2-5d) 高の試料で、当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの染色された年輪幅を比較した。いずれの染料注入部位においても、最外年輪に有意差が認められなかった。最外 2 年輪及び 3 年輪では、当年根を切断したサンプルの染色された年輪幅は幹を切断したサンプルより有意に小さかった (図 2-5c, d)。

染料注入部から 5cm 高の最外 3 年輪では、当年根を切断したサンプルの染色された道管の割合は幹を切断したサンプルより有意に小さかった (図 2-5e)。対照的に、染料注入部から 15cm 高では、当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの最外年輪の染色された道管の割合に有意な差は認められなかった (図 2-5f)。しかし、2 年輪目と 3 年輪目において、当年根を切断したサンプルの染色された道管の割合は幹を切断したサンプルより有意に小さかった (図 2-5f)。したがって、当年根を切断したサンプルでは染料が主に最外年輪を通じて輸送されることが示されたのに対し、幹を切断したサンプルは外側の複数年輪を通じて染料を輸送していた。

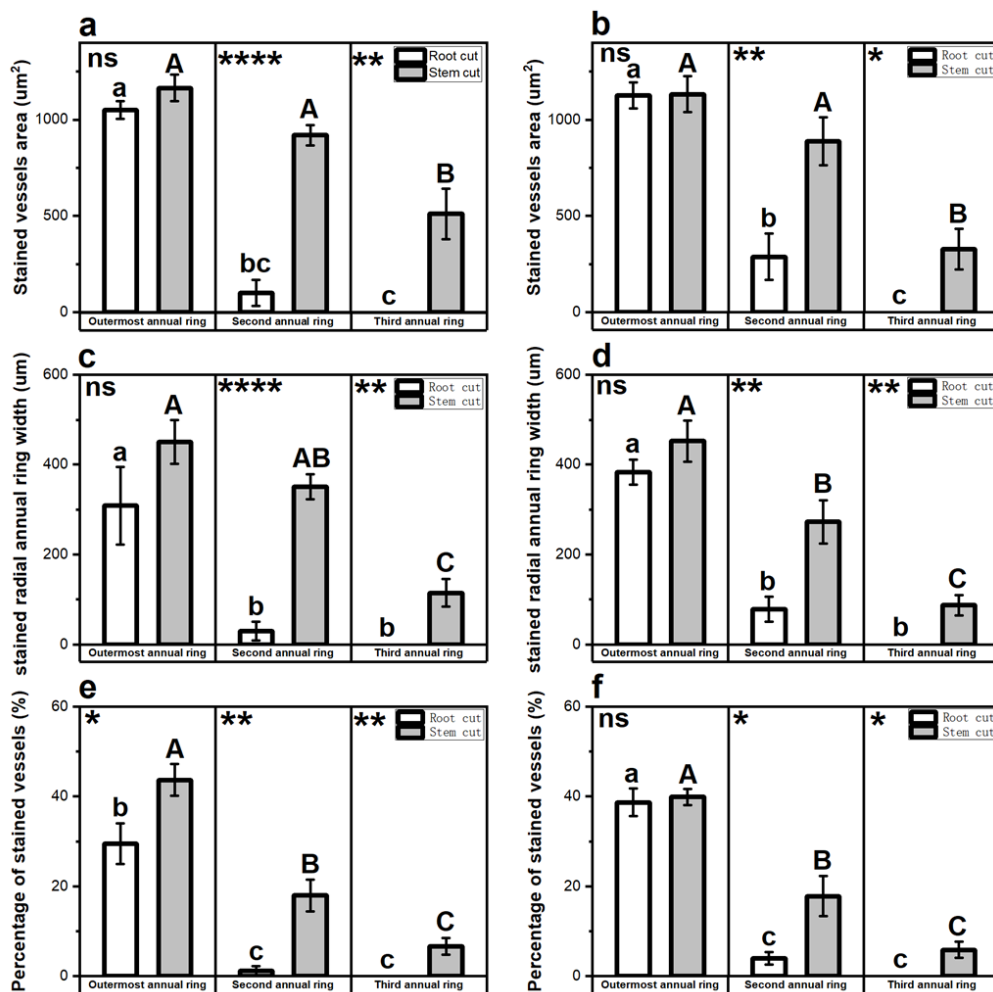


図 2-5. 当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの染料注入部から 5cm (a) と 15cm (b) 高における各年輪内の染色された道管の平均面積 (a:染料注入部から 5cm 高、b:染料注入部から 15 cm高)、年輪幅 (c:染料注入部から 5cm 高、d:染料注入部から 15 cm高)、および道管の割合 (e:染料注入部から 5cm 高、f:染料注入部から 15 cm高)。各データは平均値 ± 標準誤差を示す (n = 9)。*, **, ***, **** は $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 、および $p < 0.0001$ で有意差があることを示し、ns は有意差がないことを示す。誤差棒上の異なる小文字と大文字は、 $P < 0.05$ で当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの樹皮から 3 年輪目に有意差があることを示す。

2.3.2 木部の水分分布

染料注入部から 10cm 高の当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの低温走査電子顕微鏡像において、最外二年輪の晩材（図 2-6a, b）および樹皮から 2 年輪目と 3 年輪目の年輪境界（図 2-6c）に水で満たされた道管が認められた。

染料注入部から 10cm 高の最外三年輪目における水で満たされた道管の割合は、当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプル間で差が認められなかった。最外年輪から樹皮から 3 年輪目にかけて、水で満たされた道管の割合は減少した（図 2-7）。

2.3.3 木部の染料分布と水分分布の関係

サンプルの切断部位（当年根切断または幹切断、図 2-6）に関わらず、全てのサンプルで観察された水分分布の状況は類似していた。幹を切断したサンプルでは、各年輪における染料と水の分布状況がほぼ一致した（図 2-3b, d, f, 図 2-6）。当年根を切断したサンプルの最外年輪でも類似の染料と水の分布状況が観察された。しかし、樹皮から 2 年輪目と 3 年輪目では染料と水の分布状況が異なっていた（図 2-3a, c, e, 図 2-6）。全てのサンプルの最外 3 年輪のいくつかの水分分布が観察されていない道管の内腔にチロースの発生が観察された（図 2-6）。

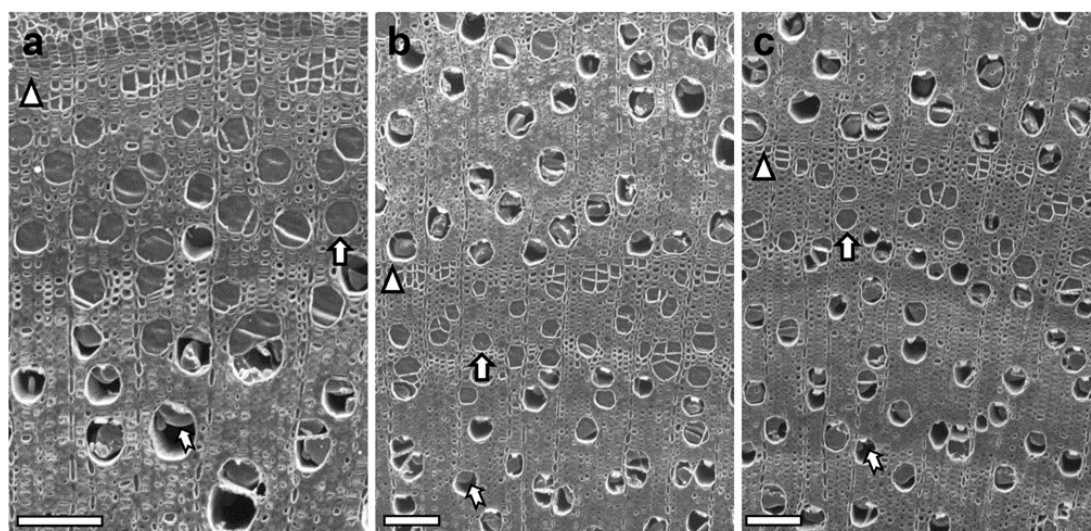


図 2-6. 染料注入部から 10cm 高の最外 3 年輪の連続した低温走査電子顕微鏡像。(a) 最外年輪、(b) 樹皮から 2 年輪目、(c) 樹皮から 3 年輪目の水分分布状況。三角形：各年輪の年輪境界。大きい矢印：水で満たされた道管。小さい矢印：道管腔内に発生したチロース。スケールバー：100 μm 。

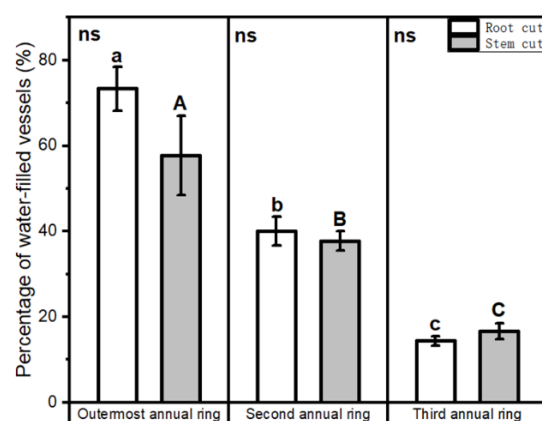


図 2-7. 当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの染料注入部から 10cm 高の各年輪の水で満たされた道管の割合 (n = 3)。各データは平均値 ± 標準誤差を示す。ns は根切断サンプルと幹切断サンプル間に有意差が認められなかったことを示す。誤差棒上の異なる小文字と大文字は、 $P < 0.05$ で当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの最外 3 年輪目に有意差があることを示す。

2.3.4 通水効率

当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの染料注入部から 5cm (図 2-8a) および 15cm (図 2-8b) 高の最外 3 年輪におけるすべての道管の平均通水効率には、有意差が認められなかった。

当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの 5cm 高で、最外年輪における染色された道管の平均通水効率には、有意な差が認められなかった (図 2-8c)。しかし、樹皮から 2 年輪目と 3 年輪目では、当年根を切断したサンプルの通水効率は幹を切断したサンプルより有意に低かった (図 2-8c)。一方、15cm 高では、外側の 2 つ年輪における染色された道管の平均通水効率は、当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの間に有意な差が認められなかった (図 2-8d)。しかし、樹皮から 3 年輪目では、当年根を切断したサンプルは幹を切断したサンプルよりも有意に低かった (図 2-8d)。

同じ染料注入部位の 5cm と 15cm 高の試料の染色道管の平均通水効率を比較した (図 2-8e, f)。当年根を切断したサンプル (図 2-8e) および幹を切断したサンプル (図 2-8f) において、有意な差は認められなかった。

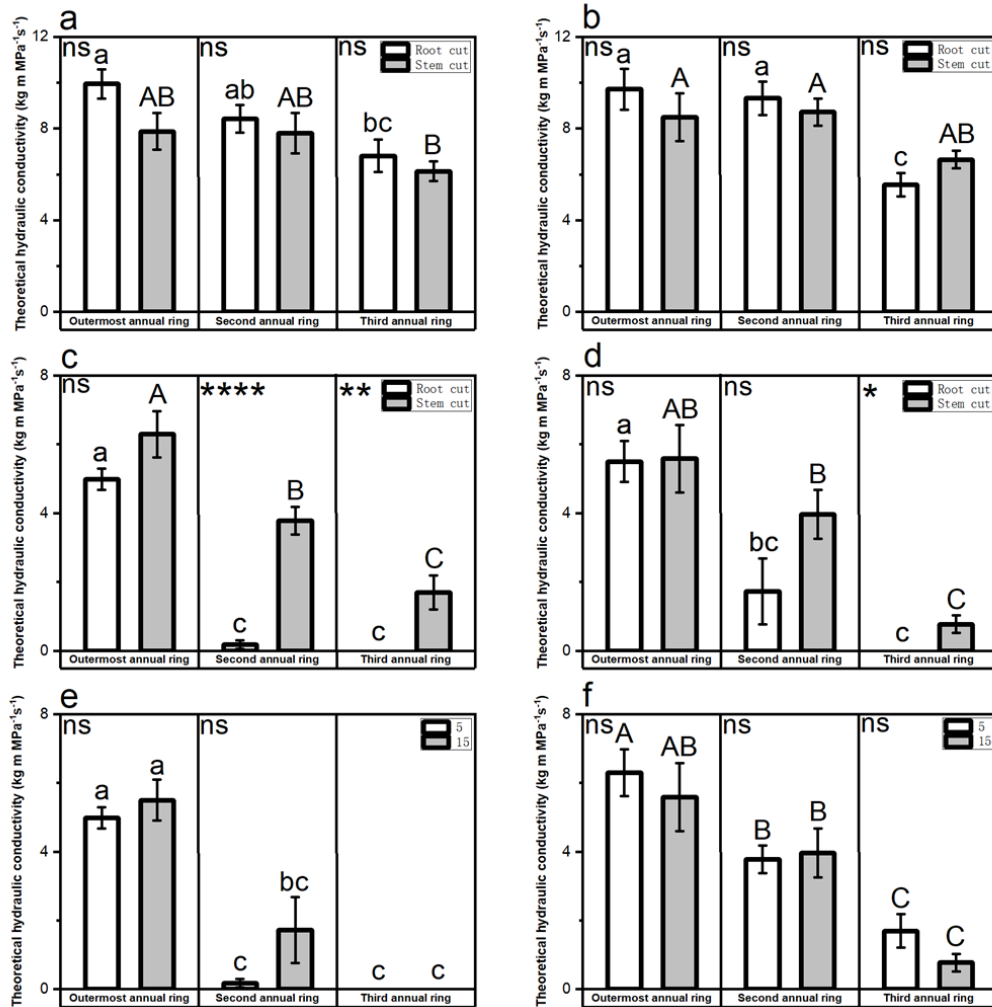


図 2-8. 当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルのすべての道管の平均通水効率 (n = 9) (a: 染料注入部から 5cm 高、b: 染料注入部から 15 cm 高)、染色された道管の平均通水効率 (c: 染料注入部から 5cm 高、d: 染料注入部から 15 cm 高)、染色された道管の通水効率 (e: 染料注入部から 5cm 高、f: 染料注入部から 15 cm 高)。各データは平均値 ± 標準誤差を示す。*, **, ***, **** は $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 、および $p < 0.0001$ で有意差があることを示し、ns は有意差がないことを示す。誤差棒上の異なる小文字と大文字は、 $P < 0.05$ で当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの最外三年輪目に有意差があることを示す。

同じ染料注入部位のサンプルの各年輪における染色された道管の平均通水効率が比較された（図 2-9a-d）。当年根を切断したサンプルの 5cm 高のグループでは、2 年輪目と 3 年輪目が最外年輪より通水効率が有意に小さかった（図 2-9a）。しかし、2 年輪目と 3 年輪目の間では有意な差が認められなかった（図 2-9a）。当年根を切断したサンプルの 15cm 高のグループでは、5cm 高のグループと同じ結果が認められた（図 2-9b）。幹を切断したサンプルの 5cm グループでは、2 年輪目および 3 年輪目が最外年輪よりも有意に低い値であった（図 2-9c）。さらに、2 年輪目と 3 年輪目が最外年輪より通水効率が有意に小さかった（図 2-9c）。幹を切断したサンプルの 15cm 高のグループでは、最外年輪と 2 年輪目の間で通水効率に有意差が認められなかった。しかし、最外年輪と 3 年輪目（後者が有意に小さかった）、および 2 年輪目と 3 年輪目（前者が有意に高かった）間で有意差が認められた（図 2-9d）。

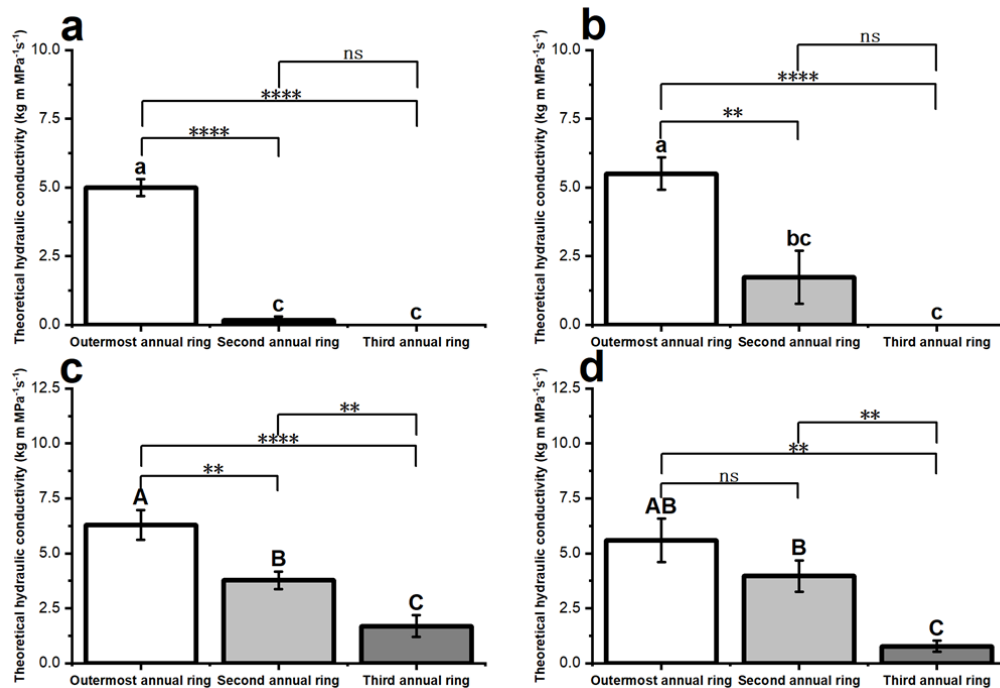


図 2-9. 当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの染料注入部から 5cm および 15cm 上の最外三年輪における染色された道管の平均通水効率の比較結果 (n = 9)。(a) 注入部から 5cm 高の当年根を切断したサンプル。(b) 注入部から 15cm 高の当年根を切断したサンプル。(c) 注入部から 5cm 高の幹を切断したサンプル。(d) 注入部から 15cm 高の幹を切断したサンプル。各データは平均値 ± 標準誤差を示す。*, **, ***, **** は $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 、および $p < 0.0001$ で有意差があることを示し、ns は有意差がないことを示す。誤差棒上の異なる小文字と大文字は、 $P < 0.05$ で当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの最外 3 年輪目に有意差があることを示す。

2.4 考察

2.4.1 木部の通水経路

既往の研究において、幹を切断したサンプルに注入された染料は、散孔材樹種では木部の外側の複数年輪を経由して移動した (Chaney and Kozłowski, 1977; Čermák et al., 2002)。ヤナギ属の樹種では木部の外側の複数年輪の晩材道管が通水機能を持っていた (Sakamoto and Sano, 2000; Umebayashi et al., 2008)。本研究では、幹を切断したサンプルの外側の複数年輪が染色された (図 2-3b, d, f および図 5a, b)。これは従来の研究 (Čermák et al., 2002; Umebayashi et al., 2008) の結果と類似している。しかし、当年根を切断したサンプルでは、最外年輪の晩材の道管と当年輪とその前年に形成された年輪の年輪境界近くの小径道管のみが染色され、内側の年輪には染料分布が認められなかった (図 2-3a, c, e および図 2-5a, b)。幹を切断したサンプルと当年根を切断したサンプル間で染料の上昇パターンに顕著な差異が認められた。幹を切断した横断面では、すべての年輪の道管が大気圧下であり、葉の蒸散によってすべての年輪の道管内を染料が輸送されたと推定される。しかし、当年根を切断したサンプルでは、最外年輪のみが負圧から大気圧になり、内側の年輪の道管の圧力状態は変わらないと推定される。最外年輪と内側の年輪の圧力差を生じたことで、最外年輪が主要な通水経路になったと考えられる。

染料は当年根を切断したサンプルの最外年輪からその前年に形成された年輪へ放射状に移動した (図 2-3a, c, e)。年輪境界を介した放射方向の通水経路としては、道管間の壁孔 (Kitin et al., 2004; Wason et al., 2019)

や放射状柔組織 (Sano et al., 2011; Pfautsch et al., 2015) である。しかし、年輪境界近くの道管間壁孔は非常に小さい直径を持っていることから (Fujii et al., 2001; Sano et al., 2008)、通水効率が低くなったと考えられる。また内側の年輪への放射方向の水移動は年輪境界における強い通水抵抗により制限され、当年根で吸収された水は主に最外年輪の道管を経由し移動したと考えられる。

染料注入部から 5cm 高の最外 3 年輪における当年根を切断したサンプルの染色された道管の割合は幹を切断した切断サンプルより有意に小さかった (図 2-5e)。さらに、当年根を切断したサンプルの染色された年輪数は幹を切断したサンプルよりも少なかった (図 2-3a-d)。当年根を切断したサンプルにおける放射方向の通水抵抗は、幹を切断したサンプルよりも高かった。既往の研究 (Steudle, 2000; Pratt et al., 2007) によると、根と幹の通水経路における通水抵抗は異なることが知られている。また、染料注入部から 15cm 高の最外年輪の染料分布は、染色された道管の割合において当年根を切断したと幹を切断したサンプルとの間に有意差が認められなかった (図 2-5f)。染料分布範囲は、染料輸送距離が増加すると共に染色範囲が減少し、染料が小径道管を経由し、サンプルの上部に到達するため、十分な時間が必要になると考えられる。

本研究では、すべてのサンプルの木部において最外三年輪に水分分布が観察された (図 2-6)。Umebayashi et al. (2008) は、ヤナギ属の外側の複数年輪が水を分布していることを示した。従来の幹を切断したサンプルによる染料注入実験では、染料と水の分布はほぼ一致した (Umebayashi et al., 2010,

2016)。ヤナギ属の幹の横断面から染料を導入すると、水で満たされた道管のほとんどに染料分布も観察された (Umebayashi et al. 2008)。しかし、本研究では、染料分布は主に最外年輪に限定され (図 2-3a, c, e および図 4a)、当年根を切断したサンプルの水分布と染料分布が異なっていた (図 2-6)。これらの結果から、当年根を切断したサンプルの内側の年輪にある水で満たされた道管は主な通水経路ではないことが示唆された。既往の研究 (Sherwin et al., 1998; Rzepecki et al., 2011) では、水で満たされた全ての道管が通水機能を持っていることが仮定されている。しかし、本研究では、最外年輪が主な通水経路担うことを示した。また、針葉樹、環孔材、散孔材樹種の樹液流測定研究では、外側年輪の樹液流速が内側年輪より高いことが示されている (Raschi et al. 1995; Tognetti et al. 1996; Zhang et al. 2015; Berdanier et al. 2016; Zhao et al. 2018)。コンピュータ断層撮影の結果、高い樹液流速を持つ外側年輪は、低い樹液流速を持つ内側年輪より水ストレスの影響を受けやすいことが示されている (Raschi et al. 1995; Tognetti et al. 1996)。これらの結果により、外側年輪が内側年輪より高い通水機能を持っていることが示唆された。したがって、根の影響を考慮せずに幹を切断または穿孔したサンプルを用いた従来の染料注入法 (Umebayashi et al., 2008; 2010; Sano et al. 2011) は、内側年輪の通水機能を過大評価する可能性が高いことが示唆された。

既往の研究では、チロースの形態と分布の特異性が示されていた (Saitoh et al., 1993; De Micco et al., 2016)。Sakamoto and Sano (2000) は、ヤナギ属の一部の木部道管で傷害チロースが発達したと報告している。本研究

では両処理ともに最外三年輪で Sakamoto and Sano (2000) の研究中に報告した傷害チロースの発生が認められた (図 2-6)。本研究で観察したチロースは、枝サンプルを採取した時の切断処理によって傷害チロースを発生した可能性があると考えている。

2.4.2 通水効率

既往の研究では、道管の直径、長さ、密度などの解剖学的特徴が樹幹木部の通水効率と直接関連していると報告されている (Yang and Tyree, 1992; Lovisolo and Schubert, 1998; Rzepecki et al., 2011; Scholz et al., 2013; Ogasa et al., 2016)、木部の横断面から加圧した後に、すべての年輪の水で満たされた道管の最大通水効率が計算されてきた (Sperry et al., 1988; Torres - Ruiz et al., 2012; Melcher et al., 2012; Ogasa et al., 2016; Islam et al., 2018; He et al., 2020)。樹幹木部の通水効率を推定するために、従来の研究は木部のすべて水で満たされた道管が通水機能を持っていると仮定し、通水効率を計算している (Sherwin et al., 1998; Rzepecki et al., 2011)。本研究では、すべての道管の平均通水効率は当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプル間で有意差が認められなかった (図 8a, b)。しかし、当年根を切断したサンプルの一部水で満たされた道管は主要な通水経路としての機能をもっていなかった (図 2-3a, c, e および 図 2-6)。計算された平均通水効率は外側年輪よりも内側年輪で低かった (図 2-9a, b)。この結果によると、既往の樹木の通水効率に関する研究が木部の通水機能を持たない内側の年輪の水で満たされた道管の通水効率を過大評価

するリスクがあることを示唆している。

当年根を切断したと幹を切断したサンプルにおいて最外三年輪の染色された道管の平均通水効率を比較した。最外年輪で最も高い通水効率が観察され、樹皮から2年輪目および3年輪目では低い通水効率が両グループとも認められた（図 2-9）。当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプル間で染色された道管の平均通水効率を比較したところ、幹を切断したサンプルの通水効率は、5cm 高の樹皮から2年輪目および5cm 高と15cm 高の樹皮から3年輪目で当年根を切断したサンプルより有意に高かった（図 2-8c, d）。これらの結果は、幹を切断したサンプルでは切断面の全年輪の道管から水が吸収され、葉の気孔への輸送が行われたことを示唆している。水移動は主に数年輪で縦方向に発生した。一方、当年根を切断したサンプルでは、当年根の切断面だけが水を吸収し、最外年輪へ輸送した。Sano et al. (2004) は、年輪境界近くの道管間壁孔が非常に小さい直径を持っていると報告している。ハーゲン・ポアズイユの法則によると、道管の直径が小さいほど通水効率は低くなる。このことから、当年根を切断したサンプルでは、最外年輪から内側年輪への放射方向の水移動は年輪境界で強い通水抵抗を持つ可能性が考えられる。しかし、既往の研究（Sherwin et al., 1998; Rzepecki et al., 2011; Kotowska et al., 2015; Zhang et al., 2017）によると、木部の複数年輪での通水効率が大きな変動がないことが示されている。したがって、従来の研究では年輪境界を通る放射方向の通水抵抗の影響が考慮されておらず、内側の年輪の通水効率が過大評価されている可能性があると考えられる。

2.5 小括

本研究では、ヤナギ属であるオノエヤナギにおいて当年生の不定根から幹を介して葉までの通水経路を調査した。また、染料注入部位の差異によって当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの間の放射方向の通水経路の違いを明らかにした。通水経路および通水効率は、当年根を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの間で著しく差異が認められた。また、本研究では、生きている樹木の年輪境界が強い放射方向の通水抵抗を持っていることを示し、今後は、樹木の水移動と通水効率を評価する際に放射方向の通水抵抗を考慮する必要があると考えられる。

第三章 オノエヤナギにおける液体窒素で凍結した H_2^{18}O トレーサーを用いたラベルサンプルの同位体濃度解析

3.1 研究背景

トレーサー注入法は、さまざまな樹種に適用可能な方法であり、長年にわたって樹木の水力学特性を特徴付け、通水経路を評価するための最も効果的な方法の一つであると考えられている (Ellmore and Ewers 1986, Meinzer et al. 2005, Kitin et al. 2010, Pfautsch et al. 2015, Treydte et al. 2021)。染料をトレーサーとして使用することは、樹木内の通水経路を可視化する直接的な手段を提供する。染料注入法を用いた研究結果に基づいて、染色された木部組織が通水機能を持つと考えられている (Venturas et al. 2017, Hammond et al. 2019)。また、散孔材、環孔材、針葉樹の通水経路は樹種により異なっている (Umebayashi et al. 2007, 2008, 2010)。しかし、染料注入法は通水経路を可視化できる一方で、顕著な欠点も存在する。第二章の研究結果を踏まえると、樹木に染料を注入するためには樹木を切断や穿孔する必要があり、道管内の圧力が負圧から大気圧に変化する。この樹木の内部圧力の変化が樹木の通水経路を変えることが認められた。また、染料の注入部位が異なることにより、染料の上昇経路が変化することが知られており、生きている樹木の通水経路を染料注入法で研究する際に潜在的な誤差を引き起こす可能性がある。そのため、生きている樹木の自然な状態を保ちながら、樹木の水力学的特徴について正確な評価を提供する代替方法を開発する必要がある。

染料トレーサーに加えて、安定同位体は植物の水力特性を研究するための貴重な方法として登場した (Dawson et al. 2002, Dubbert and Werner 2019)。成熟した樹木の樹液と周囲の深層土壌の水は同じ同位体濃度を示す (Dawson and Ehleringer 1991)。そのため、水素と酸素の安定同位体は、植物周辺の土壌 (Yao et al. 2023) や、根 (Plamboeck et al. 1999, Von Freyberg et al. 2020)、茎 (Álvarez - Cansino et al. 2010, Zhao et al. 2016, Treydte et al. 2021)、葉 (Barbour et al. 2017, Bögelein et al. 2017) を含む様々な植物部位の水力学特性分析に利用されている。いくつかの研究は、樹体内の異なる部位での水の同位体濃度変動に焦点を当てている (Zhao et al. 2016, Barbeta et al. 2022)。さらに、既往の研究では、異なる安定同位体をトレーサーとして使用し、スギ苗木の葉と根に異なる安定同位体をそれぞれ導入した。その後、異なる同位体トレーサーを吸収した葉と根での同位体の濃度変化を苗木の様々な高さで定量化した (Kagawa 2022) が、同位体トレーサーの高い時間特異性 (Dawson et al. 2002, Seeger and Weiler 2023) により、時間の経過とともに道管から周囲の組織へトレーサーが拡散することを引き起こした。トレーサーの拡散は水力学特性を過大評価することとつながる可能性がある。現在、同位体トレーサーを使用して樹木の水力学特性を評価する研究には、トレーサーを迅速に植物体内導入し、染料トレーサー注入法と同様に液体窒素で組織水を凍結して、トレーサーの拡散を制御する方法が欠けている。これまで、一種の同位体トレーサーを使用して、樹木全体で根から葉への水の軸方向の動きと分布を明らかにする研究はほとんど行われてこなかった。したがって、樹木の根に同位体トレーサー

を導入し、非破壊的に木部の軸方向の安定同位体濃度変化を評価することによって、従来より正確に生きている樹木の水力学特性を解明できると考えられる。

高温熱分解炉と同位体質量分析を組み合わせた樹木中の同位体トレーサー分析の方法は、樹木内の水移動を研究するための非常に効果的な分析方法と考えられている (Kagawa 2022)。この方法により、液体 (低温真空によって抽出された組織水) (Orlowski et al. 2013, Barbeta et al. 2022)、湿った組織 (水と有機物の混合物、以後「湿組織」とする) (Kagawa 2022)、固体 (セルロースなどの乾燥有機物) (Kagawa et al. 2015) など、様々なタイプの試料の分析が可能である。しかし、現在のところ、ミリメートル解像度で樹体内の水輸送を空間的に可視化する適切な同位体トレーサー利用方法が存在しないため、同位体トレーサーを使用した樹木の水力学特性を解明する研究は限られている。この問題を部分的に解決するために、Kagawa (2022) は木材の湿組織試料内の水の同位体比を分析する方法を提案した。しかし、この方法は、同位体トレーサー漏れを防ぐために湿組織試料をスズカプセルに封入する必要があるが、その成功率は低かった。同位体トレーサ漏れが頻繁に発生すると、データの欠損を生じ、樹体内の空間的な水移動を理解する際に同位体分析結果の解釈が難しくなる恐れがある。

本研究では、無性生殖によって栽培された当年生のオノエヤナギ (根、茎、葉はすべて当年生のもの) を利用した (Carlson, 1938;)。この簡素な当年生のオノエヤナギ苗木をモデル植物として使用し、水と同じ化学特性を示しながら水と区別して解析が可能な重酸素重水 (H_2^{18}O 、以後「重水」とす

る) をトレーサーとしてサンプルに導入した。この新しい方法は、従来の研究で使用されていた染料トレーサー注入法とは異なり、樹木の破壊処理を行わずに同位体トレーサーが導入可能である。同位体トレーサーをサンプルの根系で吸収させた後、サンプルの異なる高さで H_2^{18}O の濃度を分析し、樹木内の水移動と分布を評価するための 1 時間程度の短期間の同位体トレーサー導入法の実用性を評価した。さらに、凍結湿組織サンプルの作成に関する技術的な課題に対処するため、同位体トレーサーの漏洩を減少させ、スズカプセルによる凍結湿組織サンプルの封入方法の難易度の低下と封入成功率を向上させる新しいスズカプセル封入法を開発した。

3.2 試料と方法

3.2.1 供試木の育成と準備

30cm 長のオノエヤナギの枝 5 本を、九州大学農学部附属演習林北海道演習林（北緯 43° 15′，東経 143° 33′，標高 180-200m、北海道足寄町）の河川敷で採取した。5 月下旬に、枝の下 15cm を水道水で 250 倍に希釈したハイポネックス水溶液（HYPONeX JAPAN CORP., LTD.）に浸漬した。当年生の新芽と葉の成長を促進し、1 ヶ月間で当年生の不定根を発達することを目的としていた。その後、当年の不定根と新芽のみから成る苗木は、バーミキュライトで満たされたポットに移植され、小型ビニール温室内で自動給水システムによる毎日の灌漑が行われた（図 3-1）。サンプルの育成は 9 月末まで続け、サンプルの高さは 45-55cm になった（表 3-1；図 3-2a）。実験前に、当年の根は水道水で洗浄した。

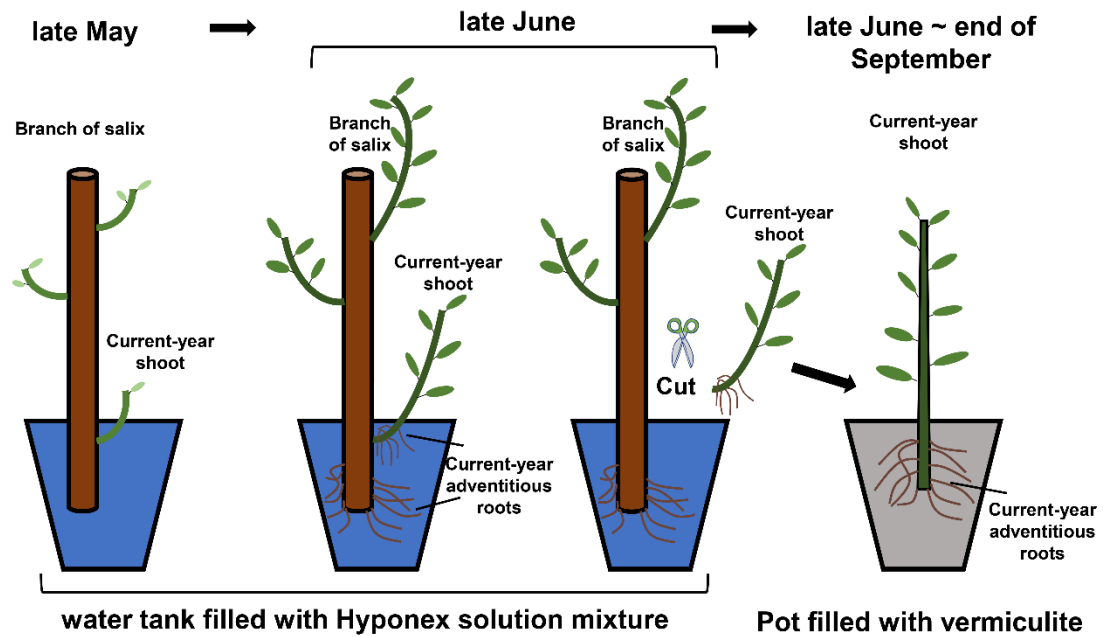


図 3-1. 当年のオノエヤナギサンプルの育成プロセスの模式図。最初に、オノエヤナギの枝と新たに芽生えた当年生の芽を栄養豊富な水溶液に浸した。浸漬後 1 ヶ月で、当年生の芽は不定根と葉を発達させた。その後、当年生の芽を枝から切り離し、当年生のオノエヤナギの苗木を作成した。これらのサンプルはその後、バーミキュライトを充填したポットに植え替えられた。

表 3-1. 各サンプルの高さと基部直径のデータ、表の最後は平均高さと平均基部直径を表示した（平均値 $\pm$ 標準誤差、n=5）。

sample number	Height (cm)	Diameter (mm)
<i>S. gracilistyla</i> -1	50.0	4.0
<i>S. gracilistyla</i> -2	54.0	6.3
<i>S. gracilistyla</i> -3	45.0	6.0
<i>S. gracilistyla</i> -4	55.0	4.6
<i>S. gracilistyla</i> -5	53.0	5.1
Average	51.4 $\pm$ 1.6	5.2 $\pm$ 0.4

3.2.2 重水トレーサー導入とサンプル採取

既往の染料注入研究の実験方法から重水トレーサーに導入の方法を改良した (Sano et al. 2005, Pratt and Jacobsen 2018)。水道水で希釈した重水トレーサー (2atom% H_2^{18}O) は、2022 年 9 月下旬の晴れの日、10 時 30 分から 11 時 30 分の間に、オノエヤナギの苗木の当年根を通じて導入した。5 本のオノエヤナギの苗木の当年根は、蒸散により重水トレーサーを吸収し、それらは幹を通じて葉に運ばれた。トレーサー導入後、急速凍結による木部のエンボリズムなどのアーティファクトの発生を防ぐため、トレーサー導入後 30 分間各苗木サンプルをプラスチック袋で覆い、蒸散を抑制し、木部の張力緩和を行った。このプロセスは、アーティファクトの発生を軽減するため非常に重要である (Ogasawara et al., 2019)。木部の張力緩和した後、すべてのサンプルは 2 分間液体窒素に浸し、急速凍結固定を行った (図 3-2a)。凍結したサンプルは酸素同位体分析のためにスズカプセル封入されるまで、 -60°C のディープフリーザーに保管した。

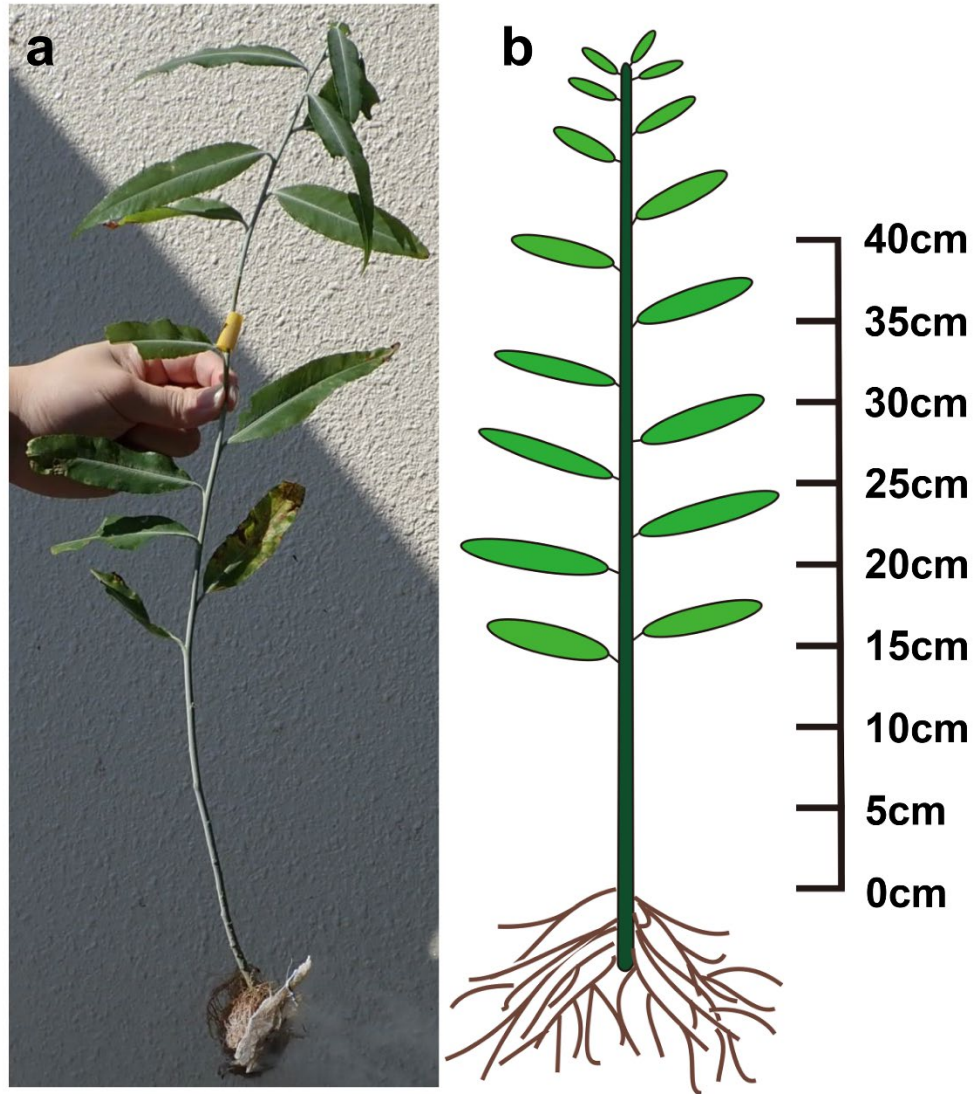


図 3-2. 当年生のオノエヤナギの苗木サンプルの画像。(a) 液体窒素で凍結されたオノエヤナギの苗木サンプル。(b) オノエヤナギの苗木サンプルの高さごとの円板の採取部位。0cm から 40cm まで試料は 5cm 間隔で切断された。

3.2.3 凍結湿組織試料の保存方法と採取装置

各オノエヤナギの苗木サンプルから凍結した高さごとの円板試料（凍結湿組織試料）を採取した後、試料は周囲と底面に保冷剤（クーラーアイスパック、キープサーモアイス KTI-51、 -51°C ）を充填したクーラーボックス

（Globeride、幅×奥行×高さ：56×35×40cm）に入れた（図 3-3a）。凍結湿組織切片を採取する時に、すべてのサンプルが凍結状態を維持するため、底部の冷却剤の上にカッティングマットを設置した（図 3-3b）。冷却剤は3時間ごとに交換し、クーラーボックスの内部温度を -15°C 以下に維持した。凍結固定した試料内の同位体トレーサーの再融解と拡散を防ぐため、凍結湿組織切片を採取した後、クーラーボックスの蓋を閉じた。

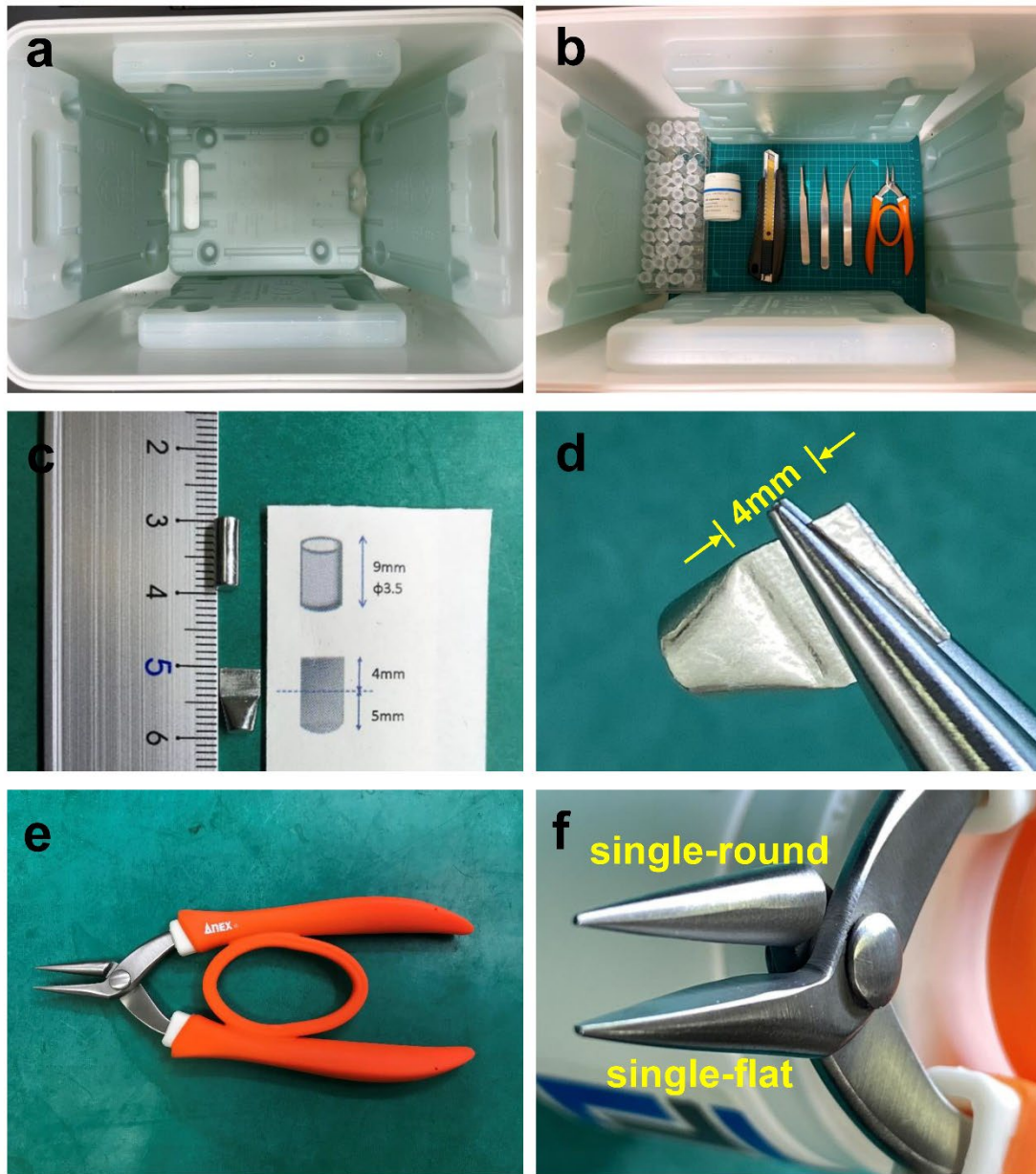


図 3-3. 凍結湿組織サンプル採取用の道具とスズカプセル封入法の画像。(a) 保冷剤を入れたクーラーボックス。(b) 凍結湿組織試料採取の道具。(c) 凍結湿組織試料のスズカプセル封入法の寸法。(d) 凍結湿組織試料のスズカプセル封入方法の詳細。(e) スズカプセル封入用のステンレス鋼の半丸/半フラットノーズプライヤー。(f) ステンレス鋼の半丸/半フラットノーズプライヤーの詳細。

3.2.4 凍結湿組織試料のスズカプセル封入法

当年根を発生した上部位を 0 cm と定義した。凍結した苗木サンプルはクーラーボックス内に設置され、苗木サンプルの幹は 0 から 40 cm 高まで 5 cm 間隔で切断され、円板を採取した（図 2b）。カッターナイフ（Scotch, Titanium Utility Knife, TI-DLA, 18 mm）を使用し、各高さの円板から厚さ 1-2mm（平均 9.08 ± 1.03 mg）の横断面凍結切片 3 枚をそれぞれ採取し、同位体比分析実験に使用した。各凍結切片を採取した後、残留重水の汚染を防ぐために、カッターナイフの刃は蒸留水で洗浄し、ティッシュペーパー（KimWipes, Kimberly Clark Corp.）で拭き取った。凍結湿組織切片の含水率を測定する際、組織内の同位体トレーサーの融解を防ぐために断熱手袋が使用した。

凍結湿組織切片を作成する前に、スズカプセル（直径：3.5 mm、高さ：9 mm；Lüdi Swiss AG）の空のカプセルの重量を測定した。その後、マイクロチューブ、カッター、ピンセット、ツイーザー、ノーズプライヤー、そして重量が計測されたスズカプセルをディープフリーザーで予冷した。予冷した道具は -15°C で保持されているクーラーボックス（図 3b）に移され、凍結湿組織切片を作成し、スズカプセルに入れた。凍結湿組織切片の重さを測定した（厚さ 1-2mm；平均 9.08 ± 1.03 mg）。同位体トレーサーリークを最小限に抑えるため、スズカプセルの口は速やかにピンセットで閉じた。その後、スズカプセルの上部（4 mm，図 3c, d）は完全に平らになるようにステンレス製の半丸/フラットノーズプライヤー（図 3e, f）で押しつぶした。封入された各カプセルはマイクロチューブ内に入れ、蓋を閉じた。すべての凍結湿組

組織切片を封入した後、クーラーボックスからマイクロチューブを取り出し、室温（24℃）で 30 分間放置した後、1 時間真空吸引を行った。（内蔵ポンプ真空デシケーター、AS ONE Corporation, VE-ALL；真空中、空気交換バルブが閉じられ、真空圧力は-0.06MPa とされ、その後バルブが開かれて通常圧力に戻された）。真空吸引後に凍結湿組織切片を封入したスズカプセルの重さを計測し、顕著なリークがないことを確認した。同位体トレーサーのリーク率が 5%を超えた場合、新しい凍結湿組織切片を作成し、再封入を行った。

なお、本研究では、すべてのサンプルの同位体トレーサーのリーク率は実験の終わりまでに 5%を超えなかった。顕著なリークがない状態で封入した試料は、水分損失を防ぐために同位体比分析までディープフリーザー（九州大学農学部附属演習林福岡演習林）または通常の冷凍庫（森林総合研究所）に保管した。

3.2.5 乾燥組織試料および液体試料の封入

凍結湿組織内の組織水の同位体比率は、同位体質量バランスを使用して計算した（Kagawa 2022）。この計算を行うためには乾燥組織サンプルの安定同位体比測定が必要である。各凍結湿組織試料をスズカプセルに封入する際、同じ円板から追加の凍結湿組織切片を作成した（乾燥組織サンプル切片を採取するため、各高さの円板から 3 つの凍結湿組織切片を追加した）。新たに採取した凍結湿組織切片の重量を測定し（重量 1.5-2 mg）、その後 24 時間の凍結乾燥を行い、乾燥した組織切片を得た。すべての乾燥組織切片は室温 24℃で重さを測定した（重量 0.66 ± 0.04 mg）。その後、乾燥組織切片を錫箔カプ

セルに入れ、ピンセットとツイーザーを使用して錫箔カプセルを立方形に整形した。

乾燥組織サンプルの安定同位体比の測定に加え、液体サンプルの安定同位体比の測定も必要である。コントロールとして水道水、2atom%の酸素同位体トレーサー（本研究中に、苗木に導入した安定同位体トレーサー）、既知の同位体比を持つ水の参照物（CB、自然同位体比率を持つ内部参照、IAEA-607 および IAEA-609）をスズカプセルに封入した。マイクロピペットを使用して、各液体 2 μ L がスズカプセルの底に注入した。その後、スズカプセルからの液体のリークを防ぐため、各スズカプセルの上部（上部から 4mm）は半丸/半フラットノーズプライヤーを使用して平らにした。各液体からそれぞれ 10 個の試料を作製した。

3.2.6 酸素同位体の分析およびデータ計算

Kagawa（2022）の実験手順に従い、高温熱分解炉（Hekatech, HT0）と質量分析計（Thermo-Finnigan, Delta V Advantage）を用いて、凍結湿組織、乾燥組織、および液体サンプルの酸素同位体比をそれぞれ測定した。凍結湿潤組織と乾燥組織の測定中の各サンプル間のメモリー効果の影響を最小限に抑えるため、同じ個体サンプルの異なる高さからの試料を高さの降順に整理し、同位体比が低い試料を同位体比が高い試料より先に分析した。同様に、酸素同位体比に基づいて液体サンプルの分析順も決めた。さらに、錫の蓄積に応じて熱分解管を交換し、通常はスズカプセル 49 個を分析した後、熱分解管の交換を行った。Kagawa（2022）の計算方法に従って、本研究の計算方法

を確立した。計算の詳細なステップは以下の通りである。

まず、各サンプルで測定された $\delta^{18}\text{O}$ の値を絶対同位体比 (R_{sample}) に変換した。計算式は次のとおりで：

$${}^nR_{\text{sample}} = ({}^n\delta / 1000 + 1) * {}^nR_{\text{std}}$$

ここで、 n は酸素同位体の質量数を表し (^{17}O の場合は 17、 ^{18}O の場合は 18)、 δ はサンプルの同位体比の値、 ${}^nR_{\text{std}}$ はウィーン標準平均海水 (VSMOW) の絶対同位体比で、 ${}^{17}R_{\text{std}} = 0.000379$ 、 ${}^{18}R_{\text{std}} = 0.0020052$ である。

その後、 ^{18}O の存在比 (A) は次の式を使用して計算した。 ${}^{18}A = {}^{18}R / ({}^{18}R + {}^{17}R + 1)$

ここで、 ${}^{18}R$ と ${}^{17}R$ はそれぞれサンプル中の ^{18}O と ^{17}O の絶対同位体比を表す。

^{18}O の存在比からの Atom% の増分 ($\Delta 18A$) は計算され、実験に導入された ^{18}O の存在比と自然存在比との差を表す。以下の通り計算された。

$$\Delta {}^{18}A = {}^{18}A_{\text{sample}} - {}^{18}A_{\text{BL}}$$

ここで、 ${}^{18}A_{\text{BL}}$ と ${}^{18}A_{\text{sample}}$ はそれぞれ、トレーサー導入前後のサンプルの ^{18}O 存在比を表す。

次に、凍結湿組織サンプルおよび凍結切片に含まれる組織水の酸素同位体存在比からの Atom% の増分を計算した。

凍結湿組織サンプルの場合：

$$\Delta {}^{18}A_F = x \cdot \Delta {}^{18}A_{TW} + (1 - x) \cdot \Delta {}^{18}A_D$$

凍結切片に含まれる組織水の場合：

$$\Delta {}^{18}A_{TW} = (\Delta {}^{18}A_F - (1 - x) \cdot \Delta {}^{18}A_D) / x$$

$\Delta {}^{18}A_F$ 、 $\Delta {}^{18}A_D$ 、および $\Delta {}^{18}A_{TW}$ はそれぞれ、凍結湿組織サンプル、乾燥組織サン

プル、および組織水サンプルの酸素同位体存在比からの Atom% の増分を表す。

また、 x は凍結湿組織サンプルにおける組織水の酸素全体に対する比率を示す。

最後に、以下の式を使用して、ヤナギの苗木個体内の水分が同位体トレーサーに置き換わった割合 ($\tau 0$) を計算した：

$$\tau 0 = \Delta^{18}A_{sample} / \Delta^{18}A_{HW}$$

ここで、 $\Delta^{18}A_{sample}$ はサンプル中の ^{18}O 同位体存在比からの Atom% の増分を示し、

$\Delta^{18}A_{HW}$ は実験地の水道水の ^{18}O 同位体存在比からの Atom% の増分を示す。

3.2.7 統計解析

高さごとで採取されたサンプルの同位体比勾配について線形回帰分析で解析した。すべての統計解析は SPSS ソフトウェアパッケージ (バージョン 27.0; SPSS Institute Ltd.) で実行した。図の作成は Origin 2021 ソフトウェア (OriginLab Corporation) を使用した。

3.3 結果

3.3.1 苗木サンプルの形態

オノエヤナギの 5 本の苗木サンプルの形態測定を行った結果、最大高さ 55cm、最小高さ 45cm、平均高さは 51.4 ± 1.6 cm であった。苗木の基部直径は、最大 6.3mm、最小 4.0mm、平均値は 5.2 ± 0.4 mm であった (表 3-1)。すべての苗木サンプルは実験を行うまで良好な成長状況を維持した。

3.3.2 封入した凍結湿組織試料の水分損失率

5本のオノエヤナギの苗木サンプルから高さごとに採取された27個の凍結湿組織試料のうち、ヤナギ1番は11個、ヤナギ2番は11個、ヤナギ3番は16個、ヤナギ4番は13個、ヤナギ5番は11個の試料が水分損失を示した。しかし、すべての封入した凍結湿組織試料で最大水分損失率は1.9%を超えていなかった。1時間の真空吸引後、封入した凍結湿組織サンプルは98%以上の含水率を維持した。5個体の平均水分損失率はそれぞれ $0.42 \pm 0.11\%$ 、 $0.43 \pm 0.11\%$ 、 $0.51 \pm 0.10\%$ 、 $0.44 \pm 0.10\%$ 、 $0.37 \pm 0.09\%$ （表3-2）であった。

表 3-2. 封入した凍結湿組織サンプルの水分損失率。この表は各サンプルの封入した凍結湿組織サンプルの平均水分損失率（平均値 $\pm$ 標準誤差, n=27）および最大水分損失率を示す。

sample number	Average (%)	maximum (%)
<i>S. gracilistyla</i> -1	0.42 $\pm$ 0.11	1.82
<i>S. gracilistyla</i> -2	0.43 $\pm$ 0.11	1.82
<i>S. gracilistyla</i> -3	0.51 $\pm$ 0.10	1.82
<i>S. gracilistyla</i> -4	0.44 $\pm$ 0.10	1.86
<i>S. gracilistyla</i> -5	0.37 $\pm$ 0.09	1.64

3.3.3 樹軸方向の H_2^{18}O 濃度分布

5本のオノエヤナギサンプルのそれぞれの27個の凍結湿組織サンプルにおける H_2^{18}O 濃度とトレーサー上昇高さの関係について線形回帰分析を行った。サンプル番号のオノエヤナギ1番、4番および5番ではすべての高さで高濃度の H_2^{18}O トレーサーを検出し、樹高と H_2^{18}O トレーサー濃度の間に有意な負の線形相関関係が認められた（オノエヤナギ1番, $R^2=0.754$, $p<0.001$; オノエヤナギ4番, $R^2=0.971$, $p<0.001$; オノエヤナギ5番目, $R^2=0.944$, $p<0.001$ ）。大部分のデータは95%信頼区間内に位置し、樹高の上昇に伴い H_2^{18}O トレーサー濃度が徐々に減少した（図3-4a, d, e）。

オノエヤナギ2番目では、0-10cmの高さで高い濃度の H_2^{18}O トレーサーが検出されたが、他のオノエヤナギのサンプルの H_2^{18}O トレーサー濃度に比べて低かった。15cm以上では、 ^{18}O の天然存在比より明らかに高い濃度が検出された。線形回帰分析により、樹高と H_2^{18}O トレーサー濃度の間に相関関係があることが示された（ $R^2=0.699$, $p<0.001$ ）、データの大部分は95%信頼区間内にあった。0-10 cmのところ、樹高上昇に伴い H_2^{18}O トレーサー濃度を減少した（図3-4b）。

オノエヤナギ3番目では、すべての凍結湿組織サンプルで高濃度の H_2^{18}O トレーサーが検出された。特に、20cm および 25cm 高のサンプルの H_2^{18}O トレーサー濃度が基部（0-10cm）と頂部（30-40cm）より著しく高かった。線形回帰分析の結果は、樹高と H_2^{18}O トレーサー濃度の間の弱い相関関係が示されたが（ $R^2=0.320$, $p<0.005$ ）、樹高上昇に伴い H_2^{18}O トレーサー濃度の減少傾向が観察された（図3-4c）。

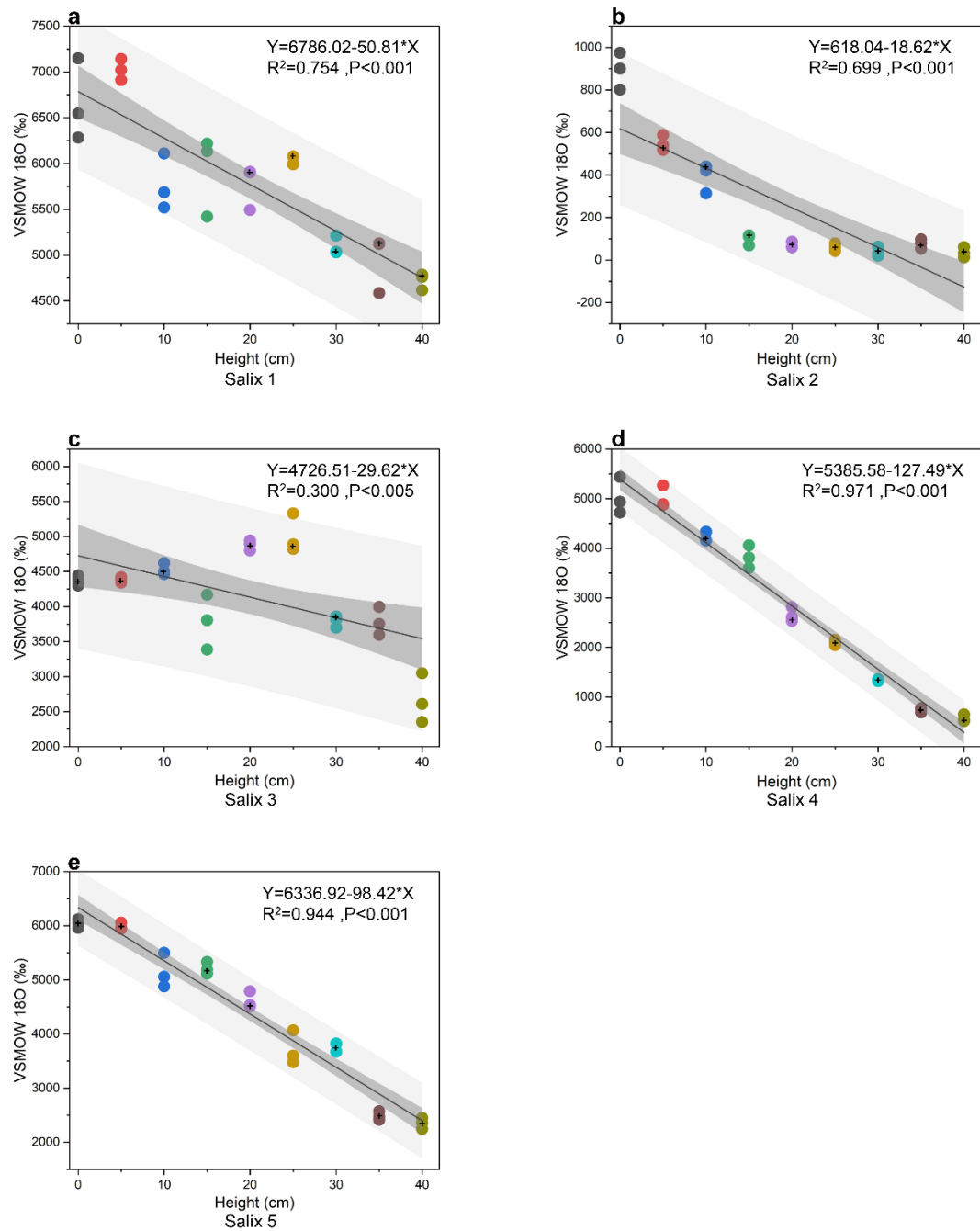


図 3-4. 凍結湿組織サンプルの樹軸方向での $H_2^{18}O$ トレーサー濃度の線形回帰分析結果(a-e)。同一高さの 3 つの凍結湿組織サンプルのデータポイントは、統一された色コードで表され、異なる高さのサンプルは異なる色コードで区別した。同一高さに重なるデータポイントはプラス記号 (+) で示した。n=27。濃い灰色のエリアは 95%信頼区間を表し、薄い灰色のエリアは 95%予測区間を表す。a, b, d, e: $P < 0.001$; c: $P < 0.005$ 。

3.3.4 H_2^{18}O トレーサーで置換された組織水の割合

5本のオノエヤナギの苗木サンプルにおける H_2^{18}O トレーサーの置換率は、樹高上昇に伴い減少する傾向が認められた（図 3-5）。オノエヤナギ 1 番目と 5 番目は、幹の基部の H_2^{18}O トレーサーで置換率が 80%を超えることが認められた。しかし、幹の上部では、オノエヤナギ 1 番目の置換率が 60%以上を維持していたが、オノエヤナギ 5 番目の置換率は約 30%を維持していた。オノエヤナギ 3 番目と 4 番目も幹の基部で 60%を超える置換率が認められた。オノエヤナギ 3 番目は 20cm から 25cm の高さで置換率がわずかに増加した後、減少傾向を示し、幹の上部で約 38%の置換率を示した。オノエヤナギ 4 番目では 20cm を超える高さで置換率が大幅に減少し、幹の上部では約 7%の置換率を示した。オノエヤナギ 2 番目は幹の基部で約 12%の置換率を示し、15cm の高さで約 1%に減少した。15cm を超える部分の置換率は 1%未満であった（図 3-5）。

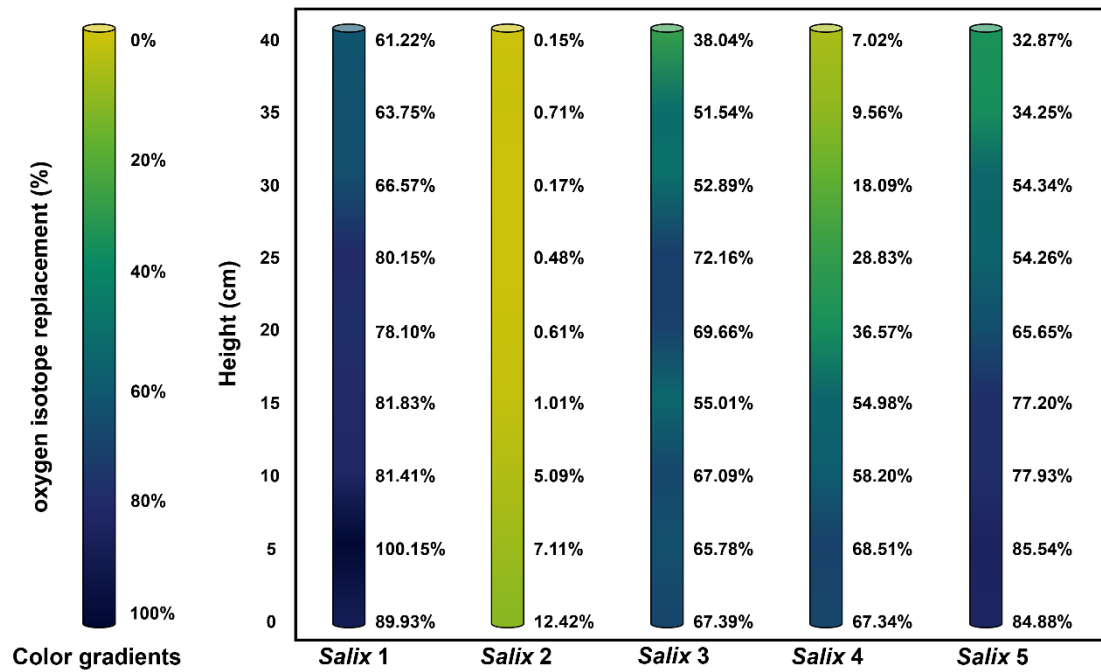


図 3-5. 各サンプル内の異なる高さ (0-40cm) での凍結湿組織サンプル中の組織水に対する H_2^{18}O トレーサーの置換率。色勾配スケールは、高い置換率から低い置換率へ（濃紺から黄色）の H_2^{18}O トレーサーの置換率を示した。

3.4 考察

3.4.1 安定同位体導入および分析方法

近年、植物の水力学特性を解明するためにさまざまな研究で安定同位体トレーサーが使用されている (Meinzer et al. 2006, Von Freyberg et al. 2020, Mennekes et al. 2021, Seeger and Weiler 2021)。既往の研究では、長期間同位体トレーサー導入法 (Stumpp et al. 2012, Nehemy et al. 2022, Kagawa 2022) が利用され、その中に一部の研究は幹の穿孔を通じてトレーサーを導入する方法が採用されている (Treydte et al. 2021)。しかし、長期間同位体トレーサーをサンプルに導入すると、トレーサーが拡散してしまう可能性が高い (Dawson et al. 2002)。トレーサーの拡散は、正確な植物の通水経路の解明に誤差をもたらすことが、従来の染料トレーサー研究によって確認されている (Umebayashi et al. 2007)。さらに、既往の研究では、トレーサーの導入部位が異なると樹木内のトレーサーの移動経路も変動することが報告されている (Seeger and Weiler 2023)。樹木に破壊処理を行った後、トレーサーを注入すると、樹体内の圧力が負圧から大気圧に変化した後に通水経路を評価するため、誤差を生じる可能性がある。長期間トレーサー導入と破壊的な導入方法に関連する誤差を軽減するため、本研究は樹木を破壊処理を行わずに樹木の蒸散と根の吸水を活用し、迅速に同位体トレーサーをオノエヤナギの苗木への導入を検討した。本研究の結果、すべてのサンプルに同位体トレーサーの分布が認められた。特に、5 個体のうち 3 個体が顕著な幹軸方向の同位体濃度勾配を示した (図 3-4a, d, e)。本研究に使用した同位体トレーサー導入法は、従来の染料トレーサー注入法のサンプルの破壊処理を行うことを回避できた。

本研究では、既往植物の水力学特性に関する研究において、液体窒素を用いて植物サンプル内の水を急速凍結する方法は非常に信頼性が高いことを明らかにした。この方法は、植物内の水分分布観察 (Utsumi et al., 2003; Fukuda et al., 2015; Yazaki et al. 2019) と染料トレーサーの移動経路を観察するために頻繁に使われている (Sano et al., 2005; Kuroda et al., 2018)。液体窒素を用いた植物サンプルの急速凍結は、凍結前後でサンプルの含水率と水分分布が一致している (Utsumi et al. 1998; Utsumi and Sano 2014)。液体窒素による凍結は、生サンプルの水分損失とトレーサーの拡散を防ぎ、実験の精度を向上させた。本研究では、すべての個体において、凍結湿組織サンプルの同位体濃度分析は、同じ高さでの3つのサンプル間で顕著な濃度の変動が認められなかった (図 3-4)。したがって、同位体トレーサーを注入法と液体窒素凍結技術を組み合わせることで、植物サンプル内の同位体濃度の変動を効果的に特定することができると考えられた。

従来の染料トレーサー注入実験と木部の水分分布の観察研究では、凍結サンプルは通常、 -12°C (Kitin et al. 2010) や -27°C (Umebayashi et al. 2016) のような温度の低温室で採取された。しかし、低温室の設置と維持のコストが高かったため、凍結サンプルの利用の実用性が制限されていた。この問題に対処するために、本研究では低温保冷剤とクーラーボックスを使用して簡易低温スペースを作成する実験計画を考案した (図 3-3a)。この簡易低温スペースは内部温度 -15°C を維持しており、試料作成プロセス中、一貫して凍結湿組織試料の組織水の融解は観察されず、封入された凍結湿組織試料から水分の顕著なリークも認められなかったことから (表 3-2)、本研究で作成した簡易低温ス

ペースの有効性を確認した。

過去の植物体内の同位体分析研究では、高温熱分解システムを使用する際、液体、湿組織、または乾燥組織試料にスズカプセル封入技術が適用されていた (Kagawa et al. 2015, Nehemy et al. 2022, Kagawa 2022)。従来の方法は、スズカプセルの開口部をペンチで折り畳み、繰り返し圧縮する方法であった (Oerter et al. 2017, Duarte et al. 2018, Kagawa 2022)。この封入方法は水を含む湿組織サンプル測定に対して信頼性が高いと報告されているが、高温蒸発によってスズカプセルに封入したサンプル内の水分がリークするといった実験エラーが生じるとされている (Oerter et al., 2017; Andreu-Hayles et al., 2019)。本研究では、簡易低温スペースで凍結湿組織試料を作成し、スズカプセル封入のプロセスを改良して水のリークを防ぐとともに、封入作業も簡便となるように従来のスズカプセル封入技術を改良した。本研究では、従来のスズ封入法で多くの試料から顕著な水分リークが確認された。先行研究中に、普通のペンチを使用した巻き込みと圧縮による折り畳み手順では、スズカプセルの周囲に傷つけて、水分リークを生じることが認められた。これに対処するため、本研究では、凍結湿組織試料または液体試料をスズカプセルに封入する際に折り畳むことはなく、半丸/半フラットノーズプライヤーを使用してカプセルの開口部のみを圧縮し、スズカプセルの損傷を抑制することによるリークを減少させた (図 3-3 d, f)。実験の結果では、98%以上の組織水がカプセル内に成功して封入され、5 個体のオノエヤナギ苗木サンプルから得られたすべての凍結湿組織試料の平均水分損失率は 0.6%未満であった (表 3-2)。スズカプセル封入法を改良によって、凍結湿組織試料で水リークは一切発生せず、

同じ位置から採取した凍結湿組織試料の間で同位体濃度も大きな変動が認められなかった。このように本研究では、水リークの原因を特定し、従来のスズカプセル封入法を改良することで、安定同位体分析のための凍結湿組織サンプルの作成の再現性と成功率を大幅に向上した。これは、スズカプセル封入法を使用して安定同位体濃度を分析する研究に非常に有益であると考ええる。

3.4.2 同位体分析

近年、樹木の水輸送を評価するために安定同位体を利用し、樹木の全体の水移動に注目した研究が年々増加している (Geris et al. 2015, Barbeta et al. 2019)。さらに最近では、樹木全体の水移動だけでなく、樹木の異なる部位の同位体濃度の変化を調査する研究も増加している (Treydte et al. 2021, Kagawa 2022)。ただし、これらの研究は主に樹木の個体レベルの実験により検討しているが、樹木の組織と細胞レベルで同位体濃度分析の研究がまだ足りないと考えている。本研究では、簡素なモデル植物として当年生のオノエヤナギの苗木を用いて、根系の物理的な破壊処理を行わずに、サンプル自体の蒸散を通じて高濃度の H_2^{18}O トレーサーを導入し、ミリメートルスケールの組織レベルでトレーサーの軸方向移動を定量的に分析した。

従来の研究では、北海道十勝地域における天然水の ^{18}O の VSMOW (ウィーン標準平均海水) スケールが-10‰から-14‰の範囲であった (Gushev et al. 2016)。本研究では、 H_2^{18}O トレーサーを導入した後、オノエヤナギ苗木サンプルの ^{18}O 存在比が十勝の天然水より大幅に上回り、苗木サンプル内すでに存在していた天然水 (樹液) と H_2^{18}O トレーサーを混合していることが示された。

また、既往の染料トレーサーを導入した結果と安定同位体トレーサーを導入した結果を比較したところ、染料トレーサーでは、サンプルの樹高の上昇に伴い染色部位の色が薄くなって、染色範囲も小さくなった (Umebayashi et al. 2008) が、本研究で測定した安定同位体濃度比も樹高上昇に伴い減少した。これは樹木内にすでに存在している天然水（樹液）を導入された安定同位体トレーサーが徐々に上昇し希釈されていることを示唆している（図 3-5）。

凍結湿組織サンプルの同位体分析により、全てのオノエヤナギの苗木サンプルにおいて地上高が増加するにつれて安定同位体トレーサー濃度が減少することが明らかになった。オノエヤナギ 1 番、4 番と 5 番の苗木サンプル（図 4a、d、e）では顕著な同位体濃度勾配が観察され、高濃度の H_2^{18}O トレーサーを短時間で導入することで、サンプル個体内の軸方向の水移動が計測できることが示唆された。オノエヤナギ 2 番と 3 番については他の苗木サンプルの結果とは異なった。オノエヤナギ 2 番では H_2^{18}O 濃度と高さとの間に顕著な線形関係があるにもかかわらず、0～10cm 高で高さの上昇に伴い H_2^{18}O 濃度が減少し、15cm 以上の部位は非常に低い H_2^{18}O 濃度を示した（図 3-4b）。一つの仮説として、オノエヤナギ 2 番では道管ネットワークにエンボリズムが発生し、道管内の通水阻害を生じていた可能性が考えられる。個体内の水の移動が妨げられることで H_2^{18}O トレーサーの輸送量が少なくなり、少量の H_2^{18}O トレーサーと樹木内にすでに存在している天然水（樹液）と混合され、非常に低い濃度になった可能性がある。オノエヤナギ 3 番については、樹高の上昇に伴って同位体濃度の減少傾向が認められたが、著しい H_2^{18}O トレーサーの濃度勾配は認められなかった ($R^2=0.300$ 、図 3-4c)。20 cm と 25 cm 部位の H_2^{18}O トレーサーの濃度の急上昇の

原因は、幹内の移動可能な天然水（樹液）が H_2^{18}O トレーサーに完全に置換されたことが考えられた。また、既往の研究により、オノエヤナギでは主に晩材道管が通水機能を持つとされている (Umebayashi et al. 2008)。本研究では、短期間の H_2^{18}O トレーサーを導入したところ、トレーサーは晩材道管のみを経由し、放射方向の拡散を行わずに移動したと推定している。さらに、同位体濃度分析では、凍結湿組織サンプル内の H_2^{18}O トレーサーと天然水（樹液）が置換された部分と置換されていない部分は一緒に分析を行なった。早材道管内では天然水（樹液）と H_2^{18}O トレーサーとの置換が遅くなるため、 H_2^{18}O トレーサーの濃度変動に影響を及ぼしたと考えられる。

3.5 小括

本研究では、オノエヤナギの苗木サンプルの生きている状態を維持しながら、従来の染料トレーサー導入法の制限を克服し、サンプル内の水移動を追跡するために非破壊的な H_2^{18}O 同位体トレーサーラベリングと液体窒素での急速凍結固定を組み合わせ、生きているサンプル内の水分移動を解析できる新たな実験方法を提案した。結果は、オノエヤナギ苗木サンプルの当年根から葉までの顕著な同位体濃度勾配を明らかにし、生きている苗木サンプルの水力学特性について、より深く理解ができようになった。また、非破壊的な短期間同位体トレーサー導入と凍結湿組織サンプルの簡易低温スペース内の封入方法は、従来の同位体トレーサーラベリングよりコストが大幅に下回ることが証明された。凍結湿組織サンプルの封入技術の改良は、実験の再現性と成功率を著しく向上させ、今後、植物生理学および生態学の同位体に関する研究においてより幅広く

応利用されることが期待される。

第4章 総合考察

4.1 今までの染料トレーサー注入法の評価

染料トレーサー注入法は、19 世紀半ばから木の水分輸送経路を研究するために幅広く使用されてきた (Caspary, 1862, Baker and James, 1933, Ellmore and Ewers, 1986)。この方法により、樹木内部の水通水経路を直接観察し、染色された木部に通水機能があることを示してきた (Kitin et al., 2010, Jacobsen and Pratt, 2012, Wason et al., 2019)。この方法の適用は、異なる樹種間の比較研究で、樹木の水力学特性に関する理解を大いに促進した (Umebayashi et al., 2007, 2008, 2010, Pratt and Jacobsen, 2018, Ganthaler and Mayr., 2021)。しかし、従来の研究で使用されている染料トレーサー注入法は、樹幹を切断あるいは穿孔を行って染料トレーサーを導入する方法である (Sano et al., 2005, Umebayashi et al., 2007, 2008, 2010)。染料を樹木の木部に直接導入することができる一方で、様々な制限もある。まず、樹木サンプルに物理的破壊を与えてから染料を導入する方法は、生きている樹木の生理状況（例えば、樹木個体内の圧力が負圧から大気圧に変わる）が変化する可能性があり、実験の正確性に影響を与える可能性がある。さらに、既往の染料トレーサー注入法は根系が樹木の水分吸収と輸送に果たす役割の重要性を十分に評価できないでいた。したがって、本研究の第2章ではオノエヤナギ苗木サンプルの根系を通じて染料トレーサーを導入する方法を提案した。従来の染料トレーサーを導入する本研究では、根系を避けられずに切断することになったが、安定同位体を利用する本手法は樹木の自然な水分の吸収過

程により近いと、樹木の水輸送および通水経路をより正確に反映していると考えられる。さらに、根系を切断したサンプルと幹を切断したサンプルの染料分布を観察することにより、幹切断処理を用いた従来の染料トレーサー注入法は、オノエヤナギ苗木サンプルの通水経路を過大評価していることを明らかにした。また、幹を切断したサンプルと根系を切断したサンプルの通水効率を比較したところ、幹を切断したサンプルの内側の年輪の通水効率も過大評価していたことが示唆された。そのため、樹木の幹を切断または穿孔して染料トレーサーを導入する方法は、樹木の最大通水経路を評価することが適切だろうと考えている。

しかし、第二章の研究に使われたオノエヤナギの苗木サンプルには制約がある。例えば、生きている樹木には多年生の根系が存在し、これらの根系は複数の年輪に接続され、複雑な通水ネットワークを形成していると考えられている。したがって、本研究で使用した簡素な植物モデルとしたオノエヤナギの苗木サンプルは樹木的水分吸収と移動中に、根系の重要性を示すことができたが、多年生の根系がある樹木の通水ネットワークを完全に再現することができなかった。さらに、根系を切断した染料トレーサーを導入する方法はある程度実験の正確性を向上させたが、複雑な根系ネットワークを持つ成熟した樹木に対しては、より信頼性が高まる研究方法の開発も必要だと考えられる。第二章の研究結果により、染料トレーサー注入法は樹木の水力学特性を研究するための非常に有効な方法でありながら、破壊的処理が樹木の水力学特性に与える影響を最小限に抑え、実験の有効性と信頼性を高めるために、引き続き方法論の改良を行う必要があると考えている。

4.2 今後の染料トレーサー注入法の利用展望

染料トレーサー注入法は樹木の通水通路を可視化するために木部の道管を染色し、組織細胞レベルで解析できることから、他の樹木の水力学特性研究方法にはない利点である (Sano et al., 2005, Umebayashi et al., 2010, Kitin et al., 2010, Wason et al., 2019)。さらに、染料トレーサー注入法は低コストで、実験操作も簡単であるため、樹木の水力学特性の研究で広く利用されている (Baker and James, 1933, Sano et al., 2005, Umebayashi et al., 2010, Kitin et al., 2010)。しかし、第2章で述べたように、染料トレーサーの注入時には樹木に物理的な破壊を与え、生きている樹木の生理状態を変える可能性があり、これらの問題は解決が必要であると考えている。したがって、今後、染料トレーサー注入法を用いて樹木の水力学特性を研究する際には、染料トレーサー注入法だけで樹木の水力学特性を検討することは避けるべきだと考えている。

今後の染料トレーサー注入法の利用については、他の樹木の水力学特性研究手法との組み合わせを推奨する。まず、染料トレーサーを用いた通水経路を可視化観察する前に、磁気共鳴画像法 (MRI) を用いて樹木の異なる部位の樹液流を把握し (Windt et al., 2006, Terada et al., 2020)、その後で染料トレーサーを用いて通水経路を可視化観察することで、実験の信頼性を大幅に向上させることができると考える。ただし、磁気共鳴画像法 (MRI) のコストが高いため、この方法を幅広く利用することは容易ではない。そのため、低いコストの代替案として、自作の樹液流センサーを使用し、プローブの長さを調節して異なる年輪の樹液流速度を測定し、また、異なる高さにセンサーを設置して

樹木の樹軸方向の樹液流速の変化を計測するとともに (Granier 1987, Smith and Allen 1996, Poyatos et al. 2016)、染料トレーサー注入法と組み合わせることで、樹木の通水通路をより正確に解析することができると考える。最後に、適切な実験条件検討し、染料トレーサー注入後に樹幹の円板サンプルを採取し、低温走査電子顕微鏡システムを使用して樹木の木部の水分分布を観察することで、実験の信頼性をさらに高めることができると考えられる。

今後染料トレーサー注入法の方法論を改善するために、2つの実験方向を提案したいと考えている。1つ目は、多年生のオノエヤナギのサンプルの異なる年生の根系をそれぞれ切断し、染料トレーサーを導入して、それぞれ異なる年の根系の切断面から樹幹木部を経由し、葉までの通水通路を確認することで、多年生のオノエヤナギサンプルの通水通路をより深く理解することが可能になると考える。2つ目は、樹木サンプルを破壊することなく直接樹木の根系に導入できる樹液と区別して、解析できるトレーサーを使用し、新たなトレーサー注入法を開発することである。そこで、本研究の第3章では、オノエヤナギの苗木サンプルで安定同位体トレーサーを使用し、幹内の同位体トレーサーの濃度分析を行った。

4.3 現段階の安定同位体トレーサー導入法の評価

最近、植物の水力学特性を研究する方法として植物個体内の安定同位体を利用する研究が増加している (Dawson et al. 2002, Álvarez - Cansino et al. 2010, Zhao et al. 2016, Treydte et al. 2021)。研究の進展に伴い、植物の異なる部位の安定同位体の分布に違いがあること (Plamboeck et al. 1999,

Barbour et al. 2017, Bögelein et al. 2017, Von Freyberg et al. 2020, Treydte et al. 2021)、そして植物体内の安定同位体分布が周囲の土壌中の安定同位体と相関関係があることも報告されている (Dawson and Ehleringer 1991, Yao et al. 2023)。さらに、最近の研究では安定同位体トレーサーが植物体内の水移動の追跡への有効性が認められた (Treydte et al. 2021, Kagawa, 2022)。しかし、安定同位体トレーサーの導入時間が長すぎるとトレーサーが拡散してしまい、正確な植物体内の水移動の解析が難しくなる問題や、安定同位体トレーサーを導入した試料の取り込み過程で同位体トレーサーが固定されずにそのまま蒸発してしまい、トレーサーを検出できないという問題が指摘されている (Zhao et al. 2016, Treydte et al. 2021, Seeger and Weiler 2023)。Kagawa (2022) は、安定同位体トレーサーを利用して、針葉樹の苗木の個体内のトレーサー移動を明らかにする研究において、樹体内の安定同位体トレーサーの移動状況を定量化する分析を行ったが、湿潤組織試料のスズカプセル封入技術が不十分であったため、多くのスズカプセル封入した試料から組織水のリークが発生し、実験結果に影響を与えたと報告している。

以上の問題を解決するために、本研究の第三章では重酸素重水 (H_2^{18}O) をトレーサーとして使用した。この安定同位体トレーサーは水と同じ性質を持ちながら区別して分析可能で、オノエヤナギの苗木サンプルを物理的に破壊することなくサンプル個体内にトレーサーを導入することができた。この方法は以前の染料トレーサー注入法がサンプルを破壊する必要があった問題を解決し、生きている樹木の水力学特性をより正確に分析することができると考えている。さらに、トレーサー導入時間が長すぎる問題や、トレーサーを導入したサンプ

ルの採取時にトレーサーが固定されずに拡散または蒸発してしまう問題を避けるために、短時間で安定同位体トレーサーを導入し、液体窒素で迅速に凍結固定する実験方法を採用し、実験の成功率と信頼性を大幅に向上させた。また、Kagawa (2022) の研究中使用されたスズカプセル封入法を改良し、封入方法を簡素化し、スズカプセルの密封技術を最適化した。これらの改良により、スズカプセル封入法の成功率と実験結果の信頼性が大幅に向上した。第三章での実験方法の改良を通じて、改良後の安定同位体トレーサー注入法は、実験のコストと操作の難易度を軽減するため、今後の樹木の水力学特性の研究に重要な役割を果たすことが期待される。

4.4 今後の染料トレーサー注入法の利用展望

本研究の第三章では、当年生の根、幹、葉のみを含むオノエヤナギの苗木を簡素な植物モデルとして用いた。オノエヤナギの苗木サンプルに破壊処理を行わずに安定同位体トレーサーを導入し、同一年輪内の同位体トレーサーの軸方向の動きを明らかにした。将来的に、安定同位体トレーサーの研究は、樹木個体内の水力学特性に関するより複雑な問題に対処することができると考えている。例えば、成熟した樹木は複数の年輪を持ち、その通水ネットワークが複雑になる。安定同位体トレーサーを成熟した樹木に導入し、異なる年輪での同位体トレーサーの濃度の軸方向および放射方向の変動はまだ明らかにされていない。さらに、異なる種類の安定同位体トレーサーを葉や根などの異なる部位にそれぞれ導入し、液体窒素で凍結した後に異なる同位体トレーサーの分布を解析することで、師部の水輸送、葉の水吸収、形成層を介した師部と木部の

水交換、木部および師部の放射状柔組織を通じた放射方向の水移動、そして移行材を越える辺材と心材の間の水移動など、多くの樹木の水力学特性と植物生理学の現象を明らかにすることができると考えている。また今後、本研究で開発した安定同位体トレーサー導入法を現在の研究の範囲を超えて拡張し、木本植物だけでなく、草本植物や農産物での通水経路を解明するための重要なツールとして提供されることを期待している。さらに、改良した同位体トレーサーのスズカプセル封入技術は、持続可能な水資源管理と気候変動適応などの緊急課題に対処するための実用的な可能性を持っていると考える。例えば、スズカプセルに封入された同位体トレーサーを用いることで、地下水や表流水の流れや混合を詳細に追跡することが可能になり、また、気候変動が水循環に及ぼす影響を評価するために、同位体トレーサー技術を用いることで、降水量の変化や蒸発率の変動を精密に測定できる。さらに、同位体トレーサーを使用して、生態系における水の移動や分布を監視することで、湿地や河川、湖沼の保全策を強化でき、特に、水質の変化や生物多様性に与える影響を詳細に分析することが期待される。

謝辞

本研究の遂行と論文の作成に終始ご指導ご鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院准教授内海泰弘先生に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり貴重なご意見とご助言を賜りました同教授古賀信也先生、同准教授市橋隆自先生、森林総合研究所組織材質研究室香川聡博士、兵庫県立農林水産技術総合センター森林林業技術センター永井智博士、鹿児島大学育林学研究室助教安田悠子博士に深く感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり多大なご協力を賜りました森林総合研究所組織材質研究室技術補佐員秋田亜紀子氏、同技術補佐員鈴木春花氏、に厚く感謝の意を表します。

また本研究の遂行にあたりたくさんの貴重なご意見を頂きました九州大学大学院生物資源環境科学府森林生産制御学研究室のみなさまに感謝の意を表します。

最後に、これまでの生活を支え、励まし続けて頂いた家族に心から感謝します。

引用文献

- Allen, S. T., Kirchner, J. W. (2021) Potential effects of cryogenic extraction biases on inferences drawn from xylem water deuterium isotope ratios: Case studies using stable isotopes to infer plant water sources. *Hydrology and Earth System Sciences*, 1–15. <https://doi.org/10.5194/hess-2020-683>
- Álvarez-Cansino, L., Zunzunegui, M., Díaz Barradas, M. C., & Esquivias, M. P. (2010) Physiological performance and xylem water isotopic composition underlie gender-specific responses in the dioecious shrub *Corema album*. *Physiologia Plantarum*, 140(1), 32-45. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01382.x>
- Andreu-Hayles, L., Levesque, M., Martin-Benito, D., Huang, W., Harris, R., Oelkers, R., Leland, C., Martin-Fernández, J., Anchukaitis, K. J., Helle, G. (2019) A high yield cellulose extraction system for small whole wood samples and dual measurement of carbon and oxygen stable isotopes. *Chemical Geology*, 504, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.007>
- Atkinson CJ, Else MA, Taylor L, Dover CJ (2003) Root and stem hydraulic conductivity as determinants of growth potential in grafted trees of apple (*Malus pumila* Mill.). *J Exp Bot* 54: 1221–1229. doi: 10.1093/jxb/erg132
- Arndt CH (1929) The movement of sap in *Coffea arabica* L. *Am J Bot* 16: 179-190.
- Arisz, W. H. (1956) Significance of the symplasm theory for transport across the root. *Protoplasma*, 46, 5–62. <https://doi.org/10.1007/BF01248866>
- Baker H, James WO (1933) The behaviour of dyes in the transpiration stream of sycamores (*Acer pseudoplatanus* L.). *New Phytol* 32: 245–260.

- Bailey IW (1944) The development of vessels in angiosperms and its significance in morphological research. *Am J Bot* 31: 421–428.
- Barbour, M. M., Farquhar, G. D., Buckley, T. N. (2017) Leaf water stable isotopes and water transport outside the xylem. *Plant, Cell and Environment*, 40, 914–920. <https://doi.org/10.1111/pce.12845>
- Barbeta, A., Jones, S. P., Clavé, L., Wingate, L., Gimeno, T. E., Fréjaville, B., Wohl, S., Ogée, J. (2019) Unexplained hydrogen isotope offsets complicate the identification and quantification of tree water sources in a riparian forest. *Hydrology and Earth System Sciences*, 23, 2129–2146. <https://doi.org/10.5194/hess-23-2129-2019>
- Barbeta, A., Burlett, R., Martín-Gómez, P., Fréjaville, B., Devert, N., Wingate, L., Domec, J. C., Ogée, J. (2022) Evidence for distinct isotopic compositions of sap and tissue water in tree stems: Consequences for plant water source identification. *New Phytologist*, 233, 1121–1132. <https://doi.org/10.1111/nph.17857>
- Bazzaz FA (1979) The physiological ecology of plant succession. *Ann Rev Ecol Syst* 10: 351–371. doi: 10.1146/annurev.es.10.110179.002031
- Beeckman T (Ed) (2009) *Annual plant reviews, root development*. John Wiley & Sons.
- Bellini C, Pacurar DI, Perrone I (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annu Rev Plant Biol* 65: 639-666. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035645
- Berdanier AB, Miniat CF, Clark JS (2016) Predictive models for radial sap flux variation in coniferous, diffuse-porous and ring-porous temperate trees. *Tree physiol* 36: 932-941. doi: 10.1093/treephys/tpw027

- Berkelhammer M, Hu J, Bailey A, Noone DC, Still C J, Barnard H, Gochis D, Hsiao GS, Rahn T, Turnipseed A (2013) The nocturnal water cycle in an open-canopy forest. *J Geophys Res Atmos* 118: 10225–10242. doi: 10.1002/jgrd.50701
- Biscoe PV, Cohen Y, Wallace JS (1976) Daily and seasonal changes of water potential in cereals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 273: 565–580. doi: 10.1098/rstb.1976.0033
- Bögelein, R., Thomas, F. M., Kahmen, A. (2017) Leaf water ^{18}O and ^2H enrichment along vertical canopy profiles in a broadleaved and a conifer forest tree. *Plant, Cell and Environment*, 40, 1086–1103. <https://doi.org/10.1111/pce.12895>
- Bouda, M., Windt, C. W., McElrone, A. J., Brodersen, C. R. (2019) In vivo pressure gradient heterogeneity increases flow contribution of small diameter vessels in grapevine. *Nature Communications*, 10, 5645. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13673-6>
- Boyer JS (1968) Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant Physiol* 43: 1056–1062. doi: 10.1104/pp.43.7.1056
- Brodersen, C. R., McElrone, A. J., Choat, B., Matthews, M. A., Shackel, K. A. (2010) The dynamics of embolism repair in xylem: In vivo visualizations using high-resolution computed tomography. *Plant Physiology*, 154, 1088–1095. <https://doi.org/10.1104/pp.110.162396>
- Brodersen CR, Lee EF, Choat B, Jansen S, Phillips RJ, Shackel KA, McElrone AJ, Matthews MA (2011) Automated analysis of three-dimensional xylem networks using high-resolution computed tomography. *New Phytol* 191: 1168–1179. doi:

10.1111/j.1469-8137.2011.03754.x

Buckley, T. N. (2019) How do stomata respond to water status? *New Phytologist*, 224, 21–36. <https://doi.org/10.1111/nph.15899>

Calder, I. R. (1998). Water use by forests, limits and controls. *Tree Physiol* 18, 625–631. doi: 10.1093/treephys/18.8-9.625

Caldwell MM, Dawson TE, Richards JH (1998) Hydraulic lift: consequences of water efflux from the roots of plants. *Oecologia* 113: 151–161.

Carlson MC (1938) The formation of nodal adventitious roots in *Salix cordata*. *Am J Bot* 25: 721–725.

Caspary R (1862) Über die Gefässbündel der Pflanzen: vorläufige Mittheilung. *Monatsberichte der Königlich preussischen Akademie der Wissenschaften*: 448–483.

Cermák J, Jiménez SM, M González-Rodríguez A, Morales D (2002) Laurel forests in Tenerife, Canary islands. *Trees* 16: 538–546. doi: 10.1007/s00468-002-0198-y

Chaney WR, Kozlowski TT (1977) Patterns of water movement in intact and excised stems of *Fraxinus americana* and *Acer saccharum* seedlings. *Ann Bot* 41: 1093–1100. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a085398

Choné, X, Van Leeuwen C, Dubourdieu D, Gaudillère JP (2001) Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. *Ann Bot* 87: 477–483. doi: 10.1006/anbo.2000.1361

Cocozza, C., Penna, D. (2022) Towards a more active dialogue between hydrologists and ecophysiologicals for interdisciplinary studies in forest ecosystems. *Science of the Total Environment*, 807, 150877. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150877>

- Dawson, T. E., Ehleringer, J. R. (1991) Streamside trees that do not use stream water. *Nature*, 350, 335–337. <https://doi.org/10.1038/350335a0>
- Dawson, T. E., Mambelli, S., Plamboeck, A. H., Templer, P. H., Tu, K. P. (2002) Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 507–559. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.020602.095451>
- De Micco V, Balzano A, Wheeler EA, Baas P (2016) Tyloses and gums: a review of structure, function and occurrence of vessel occlusions. *IAWA j* 37: 186–205.
- Duarte, C. M., Delgado-Huertas, A., Anton, A., Carrillo-de-Albornoz, P., López-Sandoval, D. C., Agustí, S., Almahasheer, H., Marbá, N., Hendriks, I. E., Krause-Jensen, D., Garcias-Bonet, N. (2018) Stable Isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, δD) Composition and Nutrient Concentration of Red Sea Primary Producers. *Frontiers in Marine Science*, 5, 298. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00298>
- Dubbert, M., Werner, C. (2019) Water fluxes mediated by vegetation: Emerging isotopic insights at the soil and atmosphere interfaces. *New Phytologist*, 221, 1754–1763. <https://doi.org/10.1111/nph.15547>
- Ellmore GS, Ewers FW (1985) Hydraulic conductivity in trunk xylem of elm, *Ulmus americana*. *IAWA j* 6: 303–307.
- Ellmore GS, Ewers FW (1986) Fluid flow in the outermost xylem increment of a ring-porous tree, *Ulmus americana*. *Am J Bot* 73: 1771–1774.
- Ellison D, Morris CE, Locatelli B, Sheil D, Cohen J, Murdiyarso D, ..., Sullivan CA (2017) Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Glob Environ Change* 43: 51–61. doi: 10.1016/j.gloenvcha.2017.01.002

- Evaristo J, Jasechko S, McDonnell JJ (2015) Global separation of plant transpiration from groundwater and streamflow. *Nature* 525: 91–94. doi: 10.1038/nature14983
- Fonti P, von Arx G, García-González I, Eilmann B, Sass-Klaassen U, Gärtner H, Eckstein D (2010) Studying global change through investigation of the plastic responses of xylem anatomy in tree rings. *New Phytol* 185: 42–53. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03030.x
- Fromm, J. H., Sautter, I., Matthies, D., Kremer, J., Schumacher, P., Ganter, C. (2001) Xylem water content and wood density in spruce and oak trees detected by high-resolution computed tomography. *Plant Physiology*, 127, 416–425. <https://doi.org/10.1104/pp.010194>
- Frost FH (1930) Specialization in secondary xylem of dicotyledons. I. Origin of vessel. *Botanical Gazette* 89, 67–94: doi: 10.1086/334026
- Frost FH (1931) Specialization in secondary xylem of dicotyledons. III. Specialization of lateral wall of vessel segment. *Botanical Gazette* 91: 88–96. doi: 10.1086/334128
- Fukuda, K., Kawaguchi, D., Aihara, T., Ogasa, M. Y., Miki, N. H., Haishi, T., Umebayashi, T. (2015) Vulnerability to cavitation differs between current-year and older xylem: Non-destructive observation with a compact magnetic resonance imaging system of two deciduous diffuse-porous species. *Plant, Cell and Environment*, 38, 2508–2518. <https://doi.org/10.1111/pce.12510>
- Fujii T, Lee SJ, Kuroda N, Suzuki Y (2001) Conductive function of intervessel pits through a growth ring boundary of *Machilus thunbergii*. *IAWA j* 22: 1–14.
- Ganthaler A, Mayr S (2021) Subalpine dwarf shrubs differ in vulnerability to xylem

- cavitation: An innovative staining approach enables new insights. *Physiol Plant* 172: 2011–2021. doi: 10.1111/ppl.13429
- Gates, F. C. (1914) Winter as a factor in the xerophily of certain evergreen ericads. *Botanical Gazette*, 57, 445–489. <https://doi.org/10.1086/331343>
- Geris, J., Tetzlaff, D., McDonnell, J., Soulsby, C. (2015) The relative role of soil type and tree cover on water storage and transmission in northern headwater catchments. *Hydrological Processes*, 29, 1844–1860. <https://doi.org/10.1002/hyp.10289>
- Good SP, D Noone, G Bowen (2015) Hydrologic connectivity constrains partitioning of global terrestrial water fluxes, *Science* 349: 175–177. doi: 10.1126/science.aaa5931
- Granier, A. (1987) Evaluation of transpiration in a Douglas-fir stand by means of sap flow measurements. *Tree Physiology*, 3, 309–320.
- Gusyevev, M. A., Morgenstern, U., Stewart, M. K., Yamazaki, Y., Kashiwaya, K., Nishihara, T., Kuribayashi, D., Sawano, H., Iwami, Y. (2016) Application of tritium in precipitation and baseflow in Japan: A case study of groundwater transit times and storage in Hokkaido watersheds. *Hydrology and Earth System Sciences*, 20, 3043–3058. <https://doi.org/10.5194/hess-20-3043-2016>
- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L (2006) Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiol* 26: 619–701. doi: 10.1093/treephys/26.6.689
- Hammond WM, Yu K, Wilson LA, Will RE, Anderegg WR, Adams HD (2019) Dead or dying? Quantifying the point of no return from hydraulic failure in drought-

- induced tree mortality. *New Phytol* 223: 1834–1843. doi: 10.1111/nph.15922
- He P, Gleason SM, Wright IJ, Weng E, Liu H, Zhu S, Ye Q (2020) Growing-season temperature and precipitation are independent drivers of global variation in xylem hydraulic conductivity. *Glob Chang Biol* 26: 1833–1841. doi:10.1111/gcb.14929.
- Hinckley TM, Lassoie JP, Running SW (1978) Temporal and spatial variations in water status of forest trees. *For Sci* 24: 1–72.
- Hirose S, Kume A, Takeuchi S, Utsumi Y, Otsuki K, Ogawa S (2005) Stem water transport of *Lithocarpus edulis*, an evergreen oak with radial-porous wood. *Tree Physiol* 25: 221–228. doi: 10.1093/treephys/25.2.221
- Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol* 24: 519–570. doi: 10.1146/annurev.pp.24.060173.002511
- Ikeda T, Ohtsu M (1992) Detection of xylem cavitation in field-grown pine trees using the acoustic emission technique. *Ecol Res* 7: 391–395. doi: 10.1007/bf02347106
- Ilvonen K, Palva L, Perämäki M, Joensuu R, Sepponen R (2001) MRI-based D₂O/H₂O-contrast method to study water flow and distribution in heterogeneous systems: Demonstration in wood xylem. *J Magn Reson* 149: 36–44.
- Islam M, Rahman M, Bräuning A (2018) Long-term hydraulic adjustment of three tropical moist forest tree species to changing climate. *Front Plant Sci* 9: 1761. doi: 10.3389/fpls.2018.01761
- Jacobsen AL, Pratt RB (2012) No evidence for an open vessel effect in centrifuge-based vulnerability curves of a long-vesselled liana (*Vitis vinifera*). *New Phytol* 194: 982–990. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04118.x

- Jarvis PG (1976) The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 273: 593–610. doi: 10.1098/rstb.1976.0035
- Kagawa, A., Sano, M., Nakatsuka, T., Ikeda, T., Kubo, S. (2015) An optimized method for stable isotope analysis of tree rings by extracting cellulose directly from cross-sectional laths. *Chemical Geology*, 393–394, 16–25.
- Kagawa A (2022) Foliar water uptake as a source of hydrogen and oxygen in plant biomass, *Tree Physiol* tpac055. doi: 10.1093/treephys/tpac055
- Kitin PB, Fujii T, Abe H, Funada R (2004) Anatomy of the vessel network within and between tree rings of *Fraxinus lanuginosa* (Oleaceae). *Am J Bot* 91: 779–788. doi: 10.3732/ajb.91.6.779
- Kitin P, Voelker SL, Meinzer FC, Beeckman H, Strauss SH, Lachenbruch B (2010) Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: a study by cryo-fluorescence microscopy. *Plant Physiol* 154: 887–898. doi: 10.1104/pp.110.156224
- Kotowska MM, Hertel D, Rajab YA, Barus H, Schuldt B (2015) Patterns in hydraulic architecture from roots to branches in six tropical tree species from cacao agroforestry and their relation to wood density and stem growth. *Front Plant Sci* 6: 191. doi: 10.3389/fpls.2015.00191
- Kozlowski TT, Winget CH (1963) Patterns of water movement in forest trees. *Botanical Gazette* 124: 301–311. doi: 10.1086/336210
- Klepper B (1968) Diurnal pattern of water potential in woody plants. *Plant Physiol* 43:

- 1931–1934. doi: 10.1104/pp.43.12.1931
- Kudo K, Utsumi Y, Kuroda K, Yamagishi Y, Nabeshima E, Nakaba S, Funada R (2018) Formation of new networks of earlywood vessels in seedlings of the deciduous ring-porous hardwood *Quercus serrata* in springtime. *Trees* 32: 725–734. doi: 10.1007/s00468-018-1667-2
- Kuroda, K., Yamane, K., Itoh, Y. (2018) Cellular level in planta analysis of radial movement of artificially injected caesium in *Cryptomeria japonica* xylem. *Trees*, 32, 1505–1517. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1729-5>
- Lambers, H., Oliveira, R. S. (2019) Plant water relations. *Plant physiological ecology* pp. 187–263. Springer
- Lansac AR, Zaballos JP, Martin A (1994) Seasonal water potential changes and proline accumulation in Mediterranean shrubland species. *Vegetatio* 113: 141–154. doi: 10.1007/bf00044231
- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S (2011) Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New phytol* 190: 709–723. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03518.x
- Lewis AM, Boose ER (1995) Estimating volume flow rates through xylem conduits. *Am J Bot* 82, 1112–1116.
- Levia DF, Creed IF, Hannah DM, Nanko K, Boyer EW, Carlyle-Moses DE, Bruen M (2020) Homogenization of the terrestrial water cycle. *Nat Geosci* 13: 656–658. doi: 10.1038/s41561-020-0641-y
- Lovisol C, Schubert, A (1998) Effects of water stress on vessel size and xylem

- hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L. *J Exp Bot* 49: 693–700. doi: 10.1093/jxb/49.321.693
- McCutchan H, Shackel KA (1992) Stem-water potential as a sensitive indicator of water stress in prune trees (*Prunus domestica* L. cv. French). *J Am Soc Hortic Sci* 117: 607–611. doi: 10.21273/JASHS.117.4.607
- Melcher PJ, Michele Holbrook N, Burns MJ, Zwieniecki MA, Cobb AR, Brodribb TJ, Sack L (2012) Measurements of stem xylem hydraulic conductivity in the laboratory and field. *Methods Ecol Evol* 3: 685–694. doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00204.x
- Mennekes, D., Rinderer, M., Seeger, S., Orlowski, N. (2021) Ecohydrological travel times derived from in situ stable water isotope measurements in trees during a semi-controlled pot experiment. *Hydrology and Earth System Sciences*, 25, 4513–4530. <https://doi.org/10.5194/hess-25-4513-2021>
- Meinzer FC, Clearwater MJ, Goldstein G (2001) Water transport in trees: current perspectives, new insights and some controversies. *Environ Exp Bot* 45: 239–262. doi: 10.1016/S0098-8472(01)00074-0
- Meinzer FC, James SA, Goldstein G, Woodruff D (2003) Whole-tree water transport scales with sapwood capacitance in tropical forest canopy trees. *Plant Cell Environ* 26: 1147–1155. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.01039.x
- Meinzer, F. C., Bond, B. J., Warren, J. M., Woodruff, D. R. (2005) Does water transport scale universally with tree size? *Functional Ecology*, 19, 558–565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2005.01017.x>
- Meinzer FC, Brooks JR, Domec JC, Gartner BL, Warren JM, Woodruff DR, Shaw DC

- (2006) Dynamics of water transport and storage in conifers studied with deuterium and heat tracing techniques. *Plant Cell Environ* 29: 105–114. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01404.x
- Munitz S, Netzer Y, Shtein I, Schwartz A (2018) Water availability dynamics have long-term effects on mature stem structure in *Vitis vinifera*. *Am J Bot* 105 1443–1452. doi: 10.1002/ajb2.1148
- Murakami Y, Funada R, Sano Y, Ohtani J (1999) The differentiation of contact cells and isolation cells in the xylem ray parenchyma of *Populus maximowiczii*. *Ann Bot* 84: 429–435. doi: 10.1006/anbo.1999.0931
- Nadezhdina N (1999) Sap flow index as an indicator of plant water status. *Tree physiol* 19: 885–891. doi: 10.1093/treephys/19.13.885
- Nehemy, M. F., Benettin, P., Allen, S. T., Steppe, K., Rinaldo, A., Lehmann, M. M., McDonnell, J. J. (2022) Phloem water isotopically different to xylem water: Potential causes and implications for ecohydrological tracing. *Ecohydrology*, 15, e2417. <https://doi.org/10.1002/eco.2417>
- Nonami H, Boyer JS (1990). Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissues at low water potentials. *Plant Physiol* 93: 1610–1619. doi: 10.1104/pp.93.4.1610
- Oerter, E., Singleton, M., Davisson, L. (2017) Hydrogen and oxygen stable isotope signatures of goethite hydration waters by thermogravimetry-enabled laser spectroscopy. *Chemical Geology*, 475, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2017.10.025>

- Ogasa MY, Utsumi Y, Miki NH, Yazaki K, Fukuda K (2016) Cutting stems before relaxing xylem tension induces artefacts in *Vitis coignetiae*, as evidenced by magnetic resonance imaging. *Plant Cell Environ* 39: 329–337. doi: 10.1111/pce.12617
- Olson M, Rosell JA, Martínez-Pérez C, León-Gómez C, Fajardo A, Isnard S, Vázquez-Segovia K (2020) Xylem vessel-diameter–shoot-length scaling: ecological significance of porosity types and other traits. *Ecol Monogr* 90: e01410. doi: 10.1002/ecm.1410
- Orlowski, N., Frede, H.-G., Brüggemann, N., Breuer, L. (2013) Validation and application of a cryogenic vacuum extraction system for soil and plant water extraction for isotope analysis. *Journal of Sensors and Sensor Systems*, 2, 179–193. <https://doi.org/10.5194/jsss-2-179-2013>
- Orlowski, N., Rinderer, M., Dubbert, M., Ceperley, N., Hrachowitz, M., Gessler, A., Rothfuss, Y., Sprenger, M., Heidbüchel, I., Kübert, A., Beyer, M., Zuecco, G., McCarter, C. (2023) Challenges in studying water fluxes within the soil-plant-atmosphere continuum: A tracer-based perspective on pathways to progress. *Science of the Total Environment*, 881, 163510.
- Ortuño MF, García-Orellana Y, Conejero W, Ruiz-Sánchez MC, Mounzer O, Alarcón JJ, Torrecillas A (2006) Relationships between climatic variables and sap flow, stem water potential and maximum daily trunk shrinkage in lemon trees. *Plant Soil* 279: 229–242. doi: 10.1007/s11104-005-1302-z
- Pfautsch S, Renard J, Tjoelker MG, Salih A (2015) Phloem as capacitor: radial transfer

- of water into xylem of tree stems occurs via symplastic transport in ray parenchyma. *Plant physiol* 167: 963–971. doi: 10.1104/pp.114.254581
- Plamboeck, A. H., Grip, H., Nygren, U. (1999) A hydrological tracer study of water uptake depth in a Scots pine forest under two different water regimes. *Oecologia*, 119, 452–460. <https://doi.org/10.1007/s004420050807>
- Poyatos, R., Granda, V., Molowny-Horas, R., Mencuccini, M., Steppe, K., Martínez-Vilalta, J. (2016) SAPFLUXNET: Towards a global database of sap flow measurements. *Tree Physiology*, 36, 1449–1455.
- Postlethwait SN, Rogers B (1958) Tracing the path of the transpiration stream in trees by the use of radioactive isotopes. *Am J Bot* 45: 753–757. doi: 10.2307/2439736
- Pratt RB, Jacobsen AL, Ewers FW, Davis SD (2007) Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New phytol* 174: 787–798. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02061.x
- Pratt RB, Jacobsen AL (2018) Identifying which conduits are moving water in woody plants: a new HRCT-based method. *Tree Physiol* 38: 1200–1212. doi: 10.1093/treephys/tpy034
- Raschi A, Tognetti R, Ridder H W, Béres C. (1995) Water in the stems of sessile oak (*Quercus petraea*) assessed by computer tomography with concurrent measurements of sap velocity and ultrasound emission. *Plant Cell Environ* 18: 545-554. doi: 10.1111/j.1365-3040.1995.tb00554.x
- Roach WA (1939) Plant injection as a physiological method. *Ann Bot* 3: 155–226.

- Rosner S, Heinze B, Savi T, Dalla-Salda G (2019) Prediction of hydraulic conductivity loss from relative water loss: new insights into water storage of tree stems and branches. *Physiol Plant* 165: 843–854. doi: 10.1111/ppl.12790
- Rzepecki A, Zeng F, Thomas FM (2011) Xylem anatomy and hydraulic conductivity of three co-occurring desert phreatophytes. *J Arid Environ* 75: 338–345. doi: 10.1016/j.jaridenv.2010.11.004
- Sakamoto Y, Sano Y (2000) Inhibition of water conductivity caused by watermark disease in *Salix sachalinensis*. *IAWA j* 21: 49–60.
- Sano Y (2004) Intervascular pitting across the annual ring boundary in *Betula platyphylla* var. *japonica* and *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. *IAWA j* 25: 129–140.
- Sano Y, Okamura Y, Utsumi Y (2005) Visualizing water-conduction pathways of living trees: selection of dyes and tissue preparation methods. *Tree Physiol* 25: 269–275. doi: 10.1093/treephys/25.3.269
- Sano Y, Ohta T, Jansen S (2008) The distribution and structure of pits between vessels and imperforate tracheary elements in angiosperm woods. *IAWA j* 29: 1–15.
- Sano Y, Morris H, Shimada H, Ronse De Craene LP, Jansen S (2011) Anatomical features associated with water transport in imperforate tracheary elements of vessel-bearing angiosperms. *Ann Bot* 107: 953–964. doi: 10.1093/aob/mcr042
- Saitoh T, Ohtani J, Fukazawa K (1993) The occurrence and morphology of tyloses and gums in the vessels of Japanese hardwoods. *IAWA j* 14: 359–371.
- Schlesinger WH, Jasechko S (2014) Transpiration in the global water cycle. *Agric For*

- Meteorol 189: 115–117. doi: 10.1016/j.agrformet.2014.01.011
- Scholander PF, Love WE, Kanwisher JW (1955) The rise of sap in tall grapevines. *Plant physiol* 30: 93–104.
- Scholz A, Klepsch M, Karimi Z, Jansen S (2013) How to quantify conduits in wood?. *Front Plant Sci* 4: 56. doi: 10.3389/fpls.2013.00056
- Seeger, S., Weiler, M. (2021) Temporal dynamics of tree xylem water isotopes: In situ monitoring and modeling. *Biogeosciences*, 18, 4603–4627. <https://doi.org/10.5194/bg-18-4603-2021>
- Seeger, S., Weiler, M. (2023) Dye-tracer-aided investigation of xylem water transport velocity distributions. *Hydrology and Earth System Sciences*, 27, 3393–3404. <https://doi.org/10.5194/egusphere-2022-1492>
- Sherwin HW, Pammenter NW, February ED, Vander Willigen C, Farrant JM (1998) Xylem hydraulic characteristics, water relations and wood anatomy of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *Ann Bot* 81: 567–575. doi: 10.1006/anbo.1998.0590
- Smith, D. M., Allen, S. J. (1996) Measurement of sap flow in plant stems. *Journal of Experimental Botany*, 47, 1833–1844. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.12.1833>
- Sperry, J. S., Adler, F. R., Campbell, G. S., Comstock, J. P. (1998) Limitation of plant water use by rhizosphere and xylem conductance: Results from a model. *Plant, Cell and Environment*, 21, 347–359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00287.x>
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ* 11: 35–40. doi:

10.1111/j.1365-3040.1988.tb01774.x

Steudle E (2000) Water uptake by roots: effects of water deficit. *J Exp Bot* 51: 1531–1542. doi: 10.1093/jexbot/51.350.1531

Stout PR, Hoagland DR (1939) Upward and lateral movement of salt in certain plants as indicated by radioactive isotopes of potassium, sodium, and phosphorus absorbed by roots. *Am J Bot* 26: 320–324. doi: 10.2307/2436466

Stumpp, C., Stichler, W., Kandolf, M., Šimůnek, J. (2012) Effects of land cover and fertilization method on water flow and solute transport in five lysimeters: A long-term study using stable water isotopes. *Vadose Zone Journal*, 11. <https://doi.org/10.2136/vzj2011.0075>

Strasburger E (1891) *Histologische Beiträge (III): Ueber den Bau und Die Verrichtungen Der Leitungsbahnen in Den Pflanzen*. Gustav Fischer, Jena.

Strasburger E (1893) *Histologische Beiträge (V): Ueber das Saftsteigen. Ueber die Wirkungssphäre der Kerne und Die Zellgröße*. Gustav Fischer, Jena.

Słupianek A, Dolzblasz A, Sokołowska K (2021) Xylem parenchyma—role and relevance in wood functioning in trees. *Plants* 10 1247. doi: doi.org/10.3390/plants10061247

Tognetti R, Raschi A, Béres C, Fenyvesi A, Ridder HW (1996) Comparison of sap flow, cavitation and water status of *Quercus petraea* and *Quercus cerris* trees with special reference to computer tomography. *Plant Cell Environ* 18: 928-938. doi: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00457.x

Torres-Ruiz JM, Sperry JS, Fernández JE (2012) Improving xylem hydraulic

- conductivity measurements by correcting the error caused by passive water uptake. *Physiol Plant* 146: 129–135. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01619.x
- Treydte, K., Lehmann, M. M., Wyczesany, T., Pfautsch, S. (2021) Radial and axial water movement in adult trees recorded by stable isotope tracing. *Tree Physiology*, 41, 2248–2261. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpab080>
- Tyree MT, Zimmermann MH (2002) *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Springer, Berlin, Germany.
- Umebayashi T, Utsumi Y, Koga S, Inoue S, Shiiba Y, Arakawa K, Oda K (2007) Optimal conditions for visualizing water-conducting pathways in a living tree by the dye injection method. *Tree Physiol* 27: 993–999. doi: 10.1093/treephys/27.7.993
- Umebayashi T, Utsumi Y, Koga S, Inoue S, Fujikawa S, Arakawa K, Oda K (2008) Conducting pathways in north temperate deciduous broadleaved trees. *IAWA j* 29: 247–263.
- Umebayashi T, Utsumi Y, Koga S, Inoue S, Matsumura J, Oda K, Otsuki K (2010) Xylem water-conducting patterns of 34 broadleaved evergreen trees in southern Japan. *Trees* 24: 571–583. doi: 10.1007/s00468-010-0428-7
- Umebayashi T, Morita T, Utsumi Y, Kusumoto D, Yasuda, Y, Haishi T, Fukuda K (2016) Spatial distribution of xylem embolisms in the stems of *Pinus thunbergii* at the threshold of fatal drought stress. *Tree physiol* 36: 1210–1218. doi: 10.1093/treephys/tpw050
- Utsumi Y, Sano Y, Fujikawa S, Funada R, Ohtani J (1998) Visualization of cavitated vessels in winter and refilled vessels in spring in diffuse-porous trees by cryo-

- scanning electron microscopy. *Plant Physiol* 117, 1463–1471. doi: 10.1104/pp.117.4.1463
- Utsumi Y, Sano Y, Funada R, Fujikawa S, Ohtani J (1999) The progression of cavitation in earlywood vessels of *Fraxinus mandshurica* var *japonica* during freezing and thawing. *Plant Physiol* 121: 897–904. doi: 10.1104/pp.121.3.897
- Utsumi Y, Sano Y, Funada R, Ohtani J, Fujikawa S (2003) Seasonal and perennial changes in the distribution of water in the sapwood of conifers in a sub-frigid zone. *Plant Physiol* 131: 1826–1833. doi: 10.1104/pp.102.014795
- Utsumi, Y., Sano, Y. (2014) Freeze stabilization and cryopreparation technique for visualizing the water distribution in woody tissues by X-ray imaging and cryo-scanning electron microscopy. *Electron microscopy. Methods and Protocols*, 677–688.
- Venturas, M. D., Sperry, J. S., Hacke, U. G. (2017) Plant xylem hydraulics: What we understand, current research, and future challenges. *Journal of Integrative Plant Biology*, 59, 356–389. <https://doi.org/10.1111/jipb.12534>
- von Freyberg, J., Allen, S. T., Grossiord, C., Dawson, T. E. (2020) Plant and root-zone water isotopes are difficult to measure, explain, and predict: Some practical recommendations for determining plant water sources. *Methods in Ecology and Evolution*, 11, 1352–1367. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13461>
- Walthert, L., Ganthaler, A., Mayr, S., Saurer, M., Waldner, P., Walser, M., Zweifel, R., von Arx, G. (2021) From the comfort zone to crown dieback: Sequence of physiological stress thresholds in mature European beech trees across progressive

drought. *Science of the Total Environment*, 753, 141792.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141792>

Wason JW, Brodersen CR, Huggett BA (2019) The functional implications of tracheary connections across growth rings in four northern hardwood trees. *Ann Bot* 124: 297–306. doi: 10.1093/aob/mcz076

Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N (2005) Inter-vessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselled plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant Cell Environ* 28: 800–812. doi: 0.1111/j.1365-3040.2005.01330.x

Wullschlegel SD, Meinzer FC, Vertessy RA (1998) A review of whole-plant water use studies in tree. *Tree physiol* 18: 499–512. doi: 10.1093/treephys/18.8-9.499

Yang S, Tyree MT (1992) A theoretical model of hydraulic conductivity recovery from embolism with comparison to experimental data on *Acer saccharum*. *Plant Cell Environ* 15: 633–643. doi: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb01005.x

Yao, K., Zhang, A., Rang, B., Yang, J., Liu, Y., & Wu, Y. (2023) Hydrological niche regulation induced by different resistance strategies facilitates coexistence of *P. longipes* and *L. communis* under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 175(6), e14072. <https://doi.org/10.1111/ppl.14072>

Yazaki K, Ogasa MY, Kuroda K, Utsumi Y, Kitin P, Sano Y (2019) Xylem water distribution in woody plants visualized with a cryo-scanning electron microscope. *J Vis Exp* 148: e59154. doi: 10.3791/59154

- Zhang JG, He QY, Shi WY, Otsuki K, Yamanaka N, Du S (2015) Radial variations in xylem sap flow and their effect on whole-tree water use estimates. *Hydrol Process* 29: 4993-5002. doi: 10.1002/hyp.10465
- Zhang SB, Zhang JL, Cao KF (2017) Divergent hydraulic safety strategies in three co-occurring Anacardiaceae tree species in a Chinese savanna. *Front Plant Sci* 7: 2075. doi: 10.3389/fpls.2016.02075
- Zhao, L., Wang, L., Cernusak, L. A., Liu, X., Xiao, H., Zhou, M., Zhang, S. (2016) Significant difference in hydrogen isotope composition between xylem and tissue water in *Populus euphratica*. *Plant, Cell and Environment*, 39, 1848–1857. <https://doi.org/10.1111/pce.12753>
- Zhao H, Yang S, Guo X, Peng C, Gu X, Deng C, Chen L (2018) Anatomical explanations for acute depressions in radial pattern of axial sap flow in two diffuse-porous mangrove species: implications for water use. *Tree physiol* 38: 276-286. doi: 10.1093/treephys/tpx172