

非破壊顕微画像計測法による汚染ガスに対する 気孔とその周辺細胞の反応の検討

大政 謙次

(国立公害研究所)

Study on Changes in Stomata and their Surrounding Cells Using
a Nondestructive Light Microscope System: Responses to Air Pollutants

Kenji OMASA

(The National Institute for Environmental Studies,
Tsukuba 305, Japan)

The effects of air pollutants on stomatal aperture and epidermal cells of attached sunflower leaves were observed with a remote-control light microscope system that permitted continuous observation of stomatal responses over periods of several hours. The relationship between actual stomatal opening and the stomatal conductance, measured with a porometer, was examined at different leaf ages.

The stomatal closure was observed during the exposure of $\text{SO}_2 + \text{NO}_2 + \text{O}_3$ in low concentrations (0.1 to $0.2 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$). There was a tendency for the extent of closure to increase in rise of concentration and mixture of these pollutants. The stomatal response to high concentration O_3 ($1.0 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$) fluctuated in the region at a distance from veinlet because of stomatal opening induced by water-soaking. The transient opening was less common in stomata near veins and veinlets.

There was a good correlation between actual stomatal opening and stomatal conductance in the same area of the leaf. However, the regression curves varied with the leaf age.

The results of these experiments indicate the necessity of continuous observation of individual stomata under the microscope to understand the effects of air pollutants on stomatal behavior.

Key words: Air pollutant, Light microscope, Nondestructive instrumentation, Stomatal conductance, Stomatal response.

キーワード: 気孔コンダクタンス, 気孔反応, 光学顕微鏡, 大気汚染ガス, 非破壊計測

1. はじめに

植物の生育している状態での気孔反応と環境ストレスとの関係を調べる場合、気孔反応を測定する手法として、同化箱・ポロメータ法、重量法、微気象学的測定法などがある (Sestak *et al.*, 1971; Meidner, 1981; 大政ら, 1988)。また、最近では、熱赤外画像計測法によって、葉温分布から気孔反応を画像として得る方法も開発されている (大政ら, 1981, Omasa *et al.*, 1981 a, b; Hashimoto *et al.*, 1984; Omasa, 1990)。しかし、これらの手法により得られる情報は、蒸散速度や気孔コン

ダクタンス (1/気孔拡散抵抗) といった気孔反応の間接的な情報であり、また、多くの気孔の平均的な反応に関するものである。それゆえ、気孔反応と環境ストレスとの関係を厳密に調べるためには、個々の気孔の非破壊計測が必要となる。

植物の生育環境下での個々の気孔反応の非破壊計測は、一般の光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡では困難である (Meidner and Mansfield, 1968; Meidner, 1981)。そこで、Omasa *et al.* (1983) や Kappen *et al.* (1987) は、生育環境下での気孔反応の直接観察を目的とした特殊な光学顕微鏡システムを開発し、また、画像処理技術の導入により、 $0.3 \mu\text{m}$ の精度で、気孔開度の測定を可能にした (Omasa and Onoe, 1984)。そして、光環境の

変化やSO₂暴露に伴う一個の気孔の孔辺細胞とその周辺の表皮細胞の変化を連続的に観察し(Omasa *et al.*, 1983; 1985), 気孔の直接観察による方法が, 気孔コンダクタンスの測定では得られない気孔細胞やその周辺の細胞についての貴重な情報を提供することを示した。

本論文では, 種々の環境ストレスに対する気孔反応と周辺の細胞の変化との関係を明らかにする研究の一環として, 低濃度混合ガス(SO₂ + NO₂ + O₃)や高濃度O₃などの汚染ガスに対する気孔反応と周辺の細胞の変化との関係について検討した。また, 同一個体の葉齢による気孔開度と気孔コンダクタンスとの関係についても検討した。

2. 材料と方法

2.1 実験材料

実験材料としては, 自然光型の制御温室(相賀ら, 1982)において, パーミキュライト, パーライト, ピートモス, 小礫を4:2:4:1(v/v)の比でつめたポット(直径10 cm, 高さ20 cm)で, 播種後4~6週間栽培したロシアヒマワリ(*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth)を用いた。栽培期間中, 温室内の気温は, 昼間25℃, 夜間20℃, 湿度は, 70% RH一定に保った。また, 養分欠乏と水ストレスが生じないように, 毎日, 液肥(ハイポネックス1,000倍液+キレート鉄(液肥100 l当たり3 g))で灌水した。

2.2 光学顕微鏡システム

光学顕微鏡システムは, 生育環境下での気孔反応の非破壊計測を目的として開発した遠隔操作の光学顕微鏡(Omasa *et al.*, 1983)を一部改良し, デジタルタイムベースコレクタ(SONY BVT800)をもつVTR(SONY BVU820)とイメージプロセッサ(nexus 6800 + NEC PC-9801 vm4 + MASSCOMP MC5400)を接続した(Fig.1)。

このシステムでは, 高倍率(対物レンズ50×+拡大レンズ3×+TV用アダプタレンズ)で広い作動距離(13 mm)をもつ光学顕微鏡(Bausch & Lomb, Micro Zoom)を改造し, 使用した。気孔の観察記録は, 高感度のSITカメラ(浜松フォトニクスModel C1000-12改造型)と高解像度歪の少ないTVモニター(中央無線 Model MD2002A)及びVTRにより行った。また, 必要に応じてイメージプロセッサや光ディスクを使用した。焦点, カメラ感度及びステージの移動(視野の調節)は, 別室か

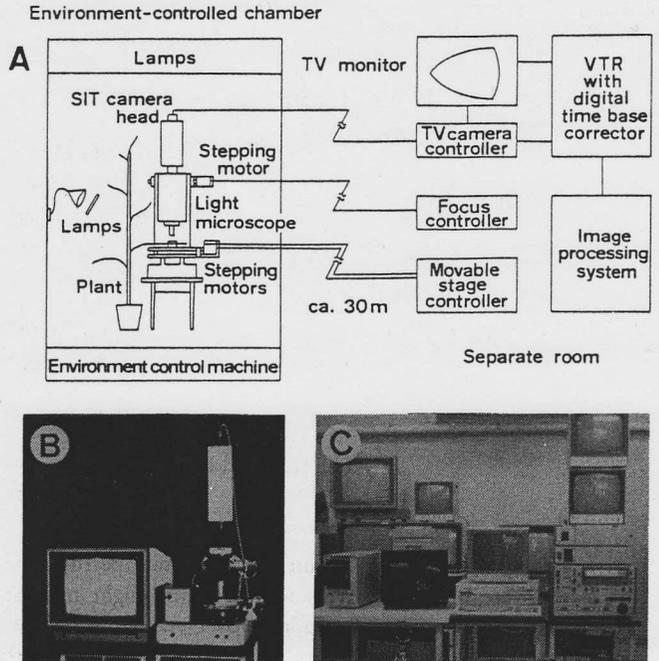


Fig. 1. Remote-control light microscope system. A: block diagram, B: light microscope system, C: VTR and image processing system.

ら遠隔で行った。葉が置かれる光学顕微鏡のステージは, 光透過性の良いアクリルで作り, 葉との接触面が少なく, 葉の両面からのガス交換が可能な構造にした。画像は, TVモニターに最高1,600倍の倍率でディスプレイすることが可能であった。気孔開度の測定精度は, モニタ観察の場合で1μm以内, 画像処理を行えば0.3μm以内であった。

2.3 実験方法

気孔の観察は, 光学顕微鏡を人工光型グロースチャンバ(相賀ら, 1982)内に入れ, 遠隔操作により行った。実験材料は, 制御温室からグロースチャンバに移し, 温室内での生育状態に近い状態で, 葉の表面が観察できるように顕微鏡のステージにセットした。そして, 気孔開度が十分定常になった後, 汚染ガス暴露を行い, その後の気孔反応や周辺細胞の変化をVTRとTVモニターにより観察記録した。そして, 再生画像から気孔開度 k_1 (気孔隙の幅 l_a と開口長(長軸方向の最大開口時における長さ) l_{bmax} の比; l_a/l_{bmax})を求めた。汚染ガスの濃度制御は, フィードバック制御により行い, 単一あるいは混合ガス状態で, 過渡および定常状態において, 設定値の±5%以内に制御した。NO₂およびO₃濃度の測定には, ケミルミネッセンス法の分析計, SO₂濃度の測定には, パルス蛍光法の分析計を用いた。なお, グロースチャン

バの温湿度は、25.0℃、60% RHに保った。光強度は、チャンバの光源（東芝 陽光ランプ+熱線カットフィルタ）に加えて、熱線カットフィルタ付きのタングステンランプで調節し、 $600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。

一方、実験に用いたヒマワリ葉の葉齢の違いによる気孔コンダクタンス(g_s)と気孔開度(k_1)との関係を調べるために、同一個体で、光条件を変えて g_s と k_1 を測定した。実際には、一定の光条件下で気孔開度が十分定常になった後、直径約15mmの領域内の約35個の気孔をランダムに選び、画像を記録した。そして、その領域の気孔コンダクタンスを拡散型ポロメータ(LI-COR Model LI-1600)により即座に測定した。この実験を同じ領域で、光強度を上げながら繰り返し、各生育ステージでの g_s と k_1 の関係を求めた。その際、気孔密度や開口長も同時に求めた。

3. 結果及び考察

3.1 気孔開度と気孔コンダクタンスとの関係

気孔コンダクタンスは、気孔の大きさや開度の他、単位面積当たりの数や構造に影響される(Meidner and Mansfield, 1968)。そこで、実験に用いたヒマワリ葉の葉齢の違いによる気孔開度と気孔コンダクタンスとの関係を調べた。

Table 1に、気孔密度(n_s)と開口長($l_{b \max}$)を、Fig. 2に、気孔開度(k_1)と気孔コンダクタンス(g_s)との関係を示す。気孔密度は、若い葉の方が高く、若い葉と老化葉では、2倍以上の差があった。開口長は、逆に、若い葉の方が小さく、1/2以下であった。これは、葉の生長に伴う気孔を含めた細胞の拡大に原因している。気孔コンダクタンスと気孔開度との関係は、各葉齢共に、気孔開度が大きくなるに伴って気孔コンダクタンスも大きくなるが、若い葉の気孔の方が、同じ気孔コンダクタンスの状態では大きな気孔開度を示した。例えば、 $g_s=1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上で、若い葉は、老化葉に比べて2倍以上の気孔開度を示した。なお、Fig. 2から、気孔が完全に閉鎖した状態における気孔コンダクタンスを求めると、成熟葉ではおおよそ $0 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ であるのに対し、若い葉では $0.5 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 程度の値を示した。若い葉で $0 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ にならないのは、クチクラ蒸散に原因しているものと考えられ、気孔が完全に閉じた状態での他の測定でも同様な結果が得られた。

気孔コンダクタンスが同じでも気孔開度が異なるという現象は、葉の葉齢だけでなく、表裏の違いや種の違いでも見られる。Omasa *et al.* (1983)によれば、ソラマ

メでは、表裏の違いにより、 $g_s=1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上で気孔開度が3倍以上異なり、また、ヒマワリとトマトの比較では、 $g_s=0.5 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ で、トマトの気孔が完全に開いている($k_1=0.3$ 以上)にもかかわらず、ヒマワリの気孔はほとんど閉鎖した状態($k_1=0.02$ 以下)であることが知られている。また、障害等による孔辺細胞や副細胞の構造の変化もまた気孔コンダクタンスと気孔開度の関係に変化をもたらす(Omasa *et al.*, 1985)。このため、気孔反応の研究には、気孔コンダクタンスの測定だけでなく、気孔の直接観察が必要不可欠である。特に、ここで示したように、同一個体でも葉の葉齢によって、気孔コンダクタンスと気孔開度との関係が変わることに注意する必要がある。ここで述べた方法は、気孔開度と気孔コンダ

Table 1 Density of stomata (n_s) and mean value of maximum length ($l_{b \max}$) of opened stomatal pore [$E(l_{b \max})$] in the same areas as that in Fig. 2.

Leaf age	Leaf area (cm ²)	Density of stomata (n_s) (pieces/mm ²)	Mean value of $l_{b \max}$ [$E(l_{b \max})$] (μm)
Young	158	115.2	19.4
Middle	197	86.6	30.1
Old	67	53.0	43.0

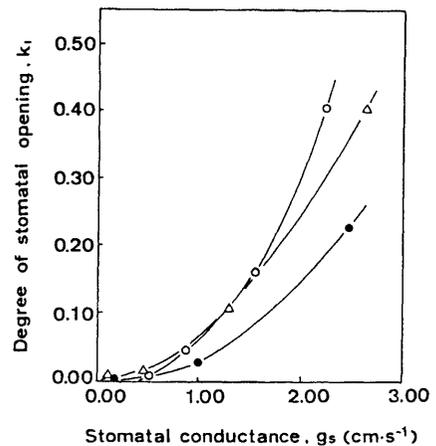


Fig. 2. Relationships between degree of stomatal opening (k_1) measured at different leaf positions of a sunflower plant and their stomatal conductances (g_s). The k_1 was calculated by $l_a/l_{b \max}$, where l_a is width of a stomatal pore and $l_{b \max}$ is maximum length of a fully opened stomatal pore. Symbols represent mean values of the k_1 . ○: young leaf, △: middle leaf, ●: old leaf. Environmental conditions: air temperature = 25.0℃; humidity = 60%RH; light intensity = 0 to $600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

クタンズとの関係を求める場合、従来の直接検鏡やレプリカ法などに比べて、迅速で、かつ正確な測定が可能である。

3.2 汚染ガスに対する気孔反応と周辺細胞の変化

大気が汚染されていると、汚染ガスが気孔を介して植物体内に吸収され、種々の生理反応が影響を受け、光合成阻害や生長阻害などを引き起こす (Unsworth and Ormrod, 1982; Koziol and Whatley, 1984; 国立公害研究所, 1984; Dempster and Manning, 1988; Schulte-Hostede *et al.*, 1988; 野内, 1988)。また、障害の程度が大きい場合には、ネクロシスやクロロシスなどの可視障害が発生する (Jacobson and Hill, 1970)。気孔は、有害な汚染ガスから生体を防御するために敏感に反応する。

Fig. 3 は、SO₂、NO₂、O₃ の低濃度混合ガス暴露に伴う気孔開度の経時変化で、Fig. 4 は、その典型的な時点 (A~F) での顕微鏡写真である。0.1 μl・l⁻¹ (ppm (v/v)) の濃度のガス暴露に伴い、暴露後約 45 分経過した時点から、気孔が閉じ始め (B→C)、80 分の時点 (C) では、約半分の開度になった。その後、一定の開度を保ったが (C→D)、ガス濃度を 0.2 μl・l⁻¹ に上げると、急激に気孔が閉じ始め (D→E→F)、約 30 分で完全に閉鎖した。その間、孔辺細胞とその周辺の細胞に、水滲や陥没等の障害は発現しなかった。

SO₂、NO₂、O₃ の単一ガス暴露に対して、ヒマワリの気孔は、この程度のガス濃度及び暴露時間ではほとんど

閉鎖しない (大政・安保, 1978; 大政ら, 1979)。しかし、Fig. 3, 4 で示されたように、混合ガス暴露下では、0.1 μl・l⁻¹ 程度のガス濃度でも気孔閉鎖が生じ、気孔閉鎖に対する“複合汚染効果”が認められた。また、定常状態に落ち着いた時の気孔開度は、ガス濃度に依存した。この汚染ガスによる気孔閉鎖のメカニズムは、正確にはわかっていないが、孔辺細胞の K⁺ 輸送に関係する酵素の直接阻害や光合成阻害に伴う植物体内の CO₂ 濃度の上昇などが影響すると考えられている (Raschke, 1979; Omasa *et al.*, 1985; Zeiger *et al.*, 1987; William,

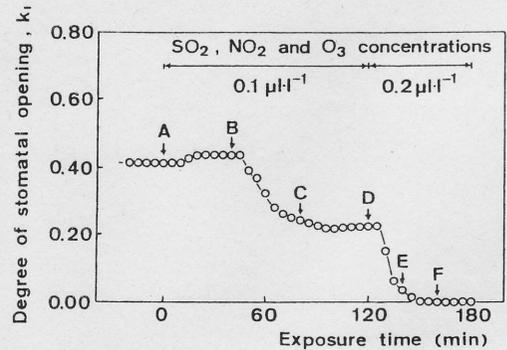


Fig. 3. Typical responses of an intact stoma of attached sunflower leaf to exposure of SO₂ + NO₂ + O₃ in low concentrations. Environmental conditions: air temperature = 25.0°C; humidity = 60%RH; light intensity = 600 μmol photons m⁻² s⁻¹.

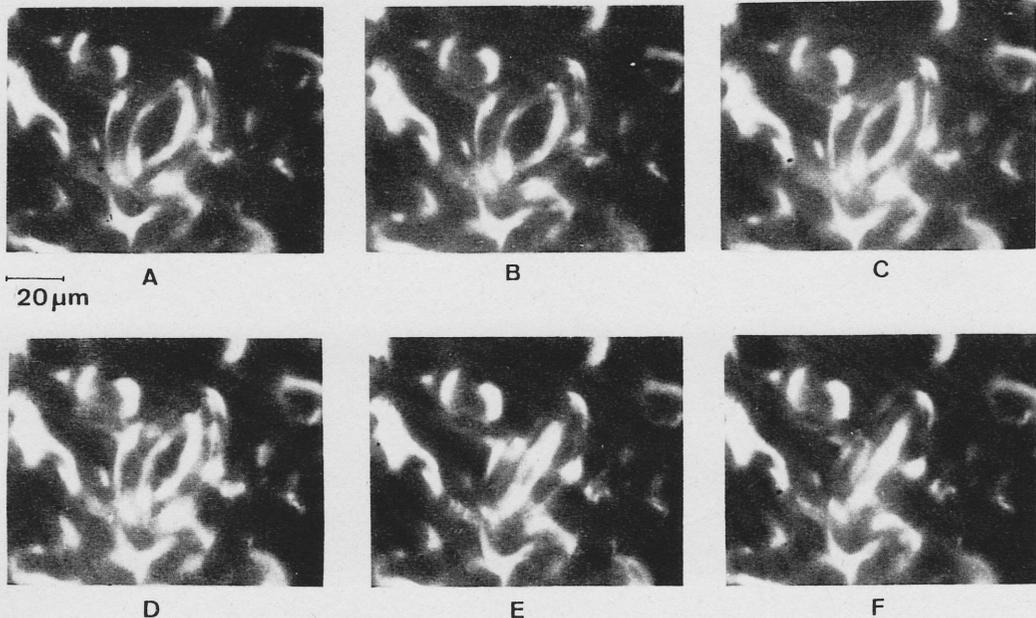


Fig. 4. Photomicrographs of the stoma shown in Fig. 3. (A) to (F) correspond to time points (A to F) in Fig. 3.

1988)。また、吸収された汚染ガスによる気孔底内での浸透ポテンシャルの上昇に伴う孔辺細胞の脱水作用や原形質膜の透過性の変化などもその原因として考えられる。

一方、汚染ガス濃度が比較的高い場合には、細胞に水滲や陥没などの急性障害が発現し、気孔は複雑な挙動を示す。Fig. 5は、 $1.0 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ の O_3 を暴露した時の小脈に隣接した気孔と離れた気孔の反応で、Fig. 6は、小脈から離れた気孔の典型的な時点(A~F)での顕微鏡写真である。小脈から離れた気孔では、 O_3 を暴露すると、即座に気孔が開き始め(A→C)、18分後(C)には最大の開度になった。その時、孔辺細胞の周辺の細胞に水滲が観察された。その後、気孔が急激に閉鎖し、それに伴って、水滲も回復した(C→D)が、25分後(D)からは、再度、気孔が開き始めた。45分後(F)には、僅かではあるが孔辺細胞の周辺の細胞に水滲が発現し始め、再び極値を示した。その後は、水滲の程度が増大し、気孔も緩やかに閉鎖した。 O_3 の暴露は90分で終了したが、暴露終了とともに、水滲が元の状態に回復した。一方、小脈に隣接した気孔は、暴露直後の気孔の一時的な開口は認められず、10分程度経過した時点から急激に気孔が閉じ始め、30分後には、ほぼ閉鎖した。その後、僅かに気孔が開く現象が見られたが、70分後には完全に閉じた。その間、細胞に水滲等の障害が認められなかったため、顕微鏡写真は省略した。なお、暴露終了後、通常の生育環境に戻したが、一日後には何れの葉にも可視障

害が発現した。

気孔の一時的な開口は、表皮細胞の障害と密接な関係がある(Omasa *et al.*, 1985)。 O_3 に対するこの現象を推察すると、まず、 O_3 により孔辺細胞よりも先に周辺の細胞が障害を受け、細胞内から水が流出し、水滲や陥没を引き起こす。その結果、孔辺細胞とその周辺の細胞の圧ポテンシャルの平衡が崩れ、気孔が開くと考えられる。その後、生体防御のために、先に述べた気孔の

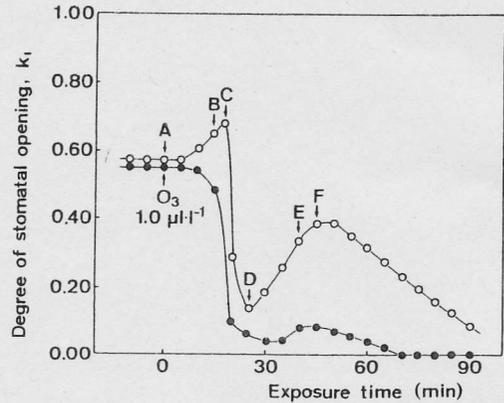


Fig. 5. Typical responses of intact stomata of attached sunflower leaves to high concentration O_3 . ○: stoma at a distance from veinlet, ●: stoma near veinlet. Environmental conditions were the same as those in Fig. 3.

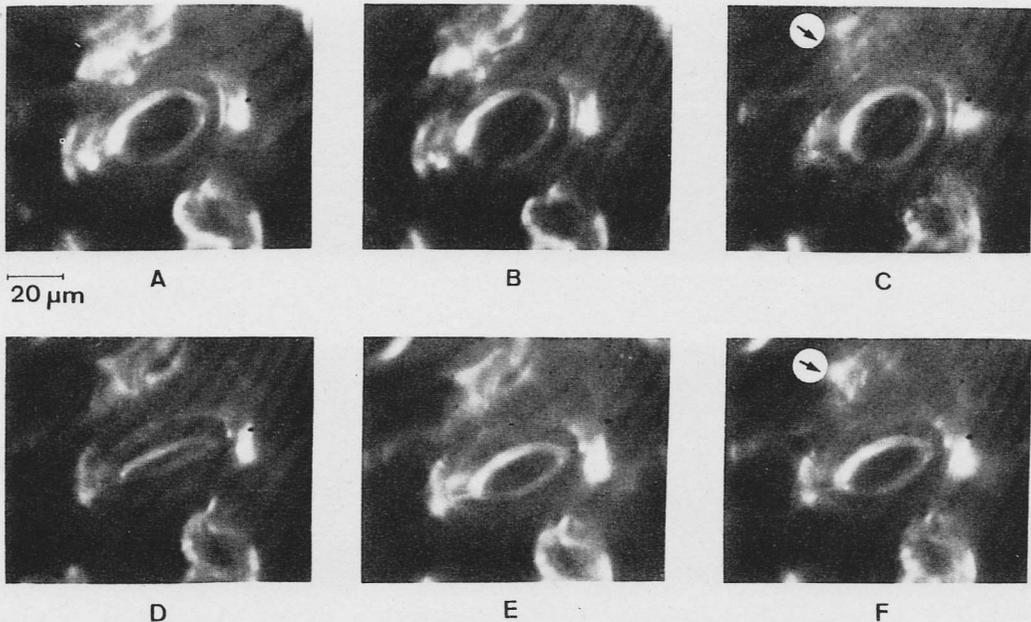


Fig. 6. Photomicrographs of the stoma at a distance from veinlet shown in Fig. 5. (A) to (F) correspond to time points (A to F) in Fig. 5. The arrows (→) in "C" and "F" indicate water-soaking of subsidiary cell.

閉口作用が働くが、開口作用も持続するので、気孔開度が大きく変動すると思われる。しかし、小脈の周辺の気孔では、小脈から表皮細胞への水の供給が十分に行われるので、暴露直後の一時的な開口は発生せず、迅速な気孔閉鎖が起こると推察される。SO₂の場合も、表皮細胞の障害との関連で気孔の一時的な開口が生じるが、現象は一過性で、O₃のように開口と閉口を繰り返さない(Omasa *et al.*, 1985)。これは、暴露初期に起こるO₃による表皮細胞の障害が可逆的でクロロシスやネクロシスへと継続的に進行しないのに対し、SO₂の場合には、不可逆的で、細胞での水滲や陥没が、直接、クロロシスやネクロシスに結びつくためであると考えられる。

現在までのところ、O₃の可視障害発現に至るメカニズムは明らかにされていない。熱赤外画像計測法による葉面解析の知見によると、SO₂では、吸収量がある閾値を越えた部位にクロロシスやネクロシスが発現するのに対し、O₃では、吸収量との相関がなく、葉脈との関連が認められる(Omasa *et al.*, 1981 a, b)。今後、水分生理的な観点も加えて、水滲やクロロシスやネクロシス等の可視障害の発現のメカニズムを明らかにする必要がある。

4. おわりに

ここで述べた方法を用いれば、植物葉を傷つけることなく、正確、かつ迅速に気孔開度と気孔コンダクタンスとの関係を調べることができる。また、生育環境を破壊することなく、種々の環境ストレスに対する気孔反応や周辺細胞の変化を連続的に観察することができる。今後、植物の器官の発達や細胞構造と関連づけて、種々の環境ストレスに対する気孔反応を調べるための一つの有力な手段となるであろう。

引用文献

- 相賀一郎・大政謙次・松本 茂, 1982: 環境庁国立公害研究所ファイトトロンとそのエネルギーの供給システム。空気調和・衛生工学, **56**, 741-751.
- Dempster, J. P. and Manning, W. J. (eds), 1988: Response of Crops to Air Pollutants. *Environ. Poll.*, **53**, 1-478.
- Hashimoto, Y., Ino, T., Kramer, P. J., Naylor, A. W. and Strain, B. R., 1984: Dynamic analysis of water stress of sunflower leaves by means of a thermal image processing system. *Plant Physiol.*, **76**, 266-269.
- Jacobson, J. S. and Hill, A. C. (eds), 1970: *Recognition of Air Pollution Injury to Vegetation: A Pictorial Atlas*. Air Poll. Control Assoc.
- Kappen, L., Andersen, G. and Losch, R., 1987: *In situ* observations of stomatal movements. *J. Exp. Bot.*, **38**, 126-141.
- 国立公害研究所, 1984: 複合大気汚染の植物影響に関する研究。国立公害研究所研究報告, **64**, 1-336. 及び Studies on Effects of Air Pollutant Mixtures on Plants Part 1 and 2. *Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.*, **65**, 1-263, **66**, 1-155.
- Koziol, M. J. and Whatley, F. R. (eds), 1984: *Gaseous Air Pollutants and Plant Metabolism*. Butterworths, London, 466p.
- Meidner, H., 1981: *Measurements of stomatal aperture and responses to stimuli*. In *Stomatal Physiology*. (ed. by P. J. Jarvis and T. A. Mansfield). Cambridge Univ. Press, Cambridge, 25-49.
- Meidner, H. and Mansfield, T. A., 1968: *Physiology of Stomata*. McGraw-Hill, London, 26-48, 69-101.
- 野内 勇, 1988: 光化学オキシダント(オゾンおよびパーオキシアセチルナイトレート)による植物葉被害および被害発現機構。農業環境技術研究所報告, 第5号 121 p.
- Omasa, K., 1990: Image instrumentation methods of plant analysis. In *Modern Methods of Plant Analysis*. New Series. Vol. 11. Physical Methods in Plant Sciences. (ed. by H. F. Linskens and J. F. Jackson). Springer-Verlag, Berlin, 203-244.
- 大政謙次・安保文彰, 1978: 植物による大気汚染物質の収着に関する研究。(I) SO₂の局所収着と可視障害発現との関係。農業気象, **34**, 51-58.
- 大政謙次・安保文彰・相賀一郎・橋本 康, 1981: 大気汚染環境下の植物の画像計測—熱赤外画像に含まれる生体情報の定量化について—。計測自動制御学会論文集, **17**, 657-663.
- 大政謙次・安保文彰・名取俊樹・戸塚 績, 1979: 植物による大気汚染物質の収着に関する研究。(II) NO₂, O₃あるいはNO₂+O₃暴露下における収着について。農業気象, **35**, 77-83.
- Omasa, K., Hashimoto, Y. and Aiga, I., 1981a: A quantitative analysis of the relationships between SO₂ or NO₂ sorption and their acute effects on plant leaves using image instrumentation. *Environ. Control. Biol.*, **19**, 59-67.
- Omasa, K., Hashimoto, Y. and Aiga, I., 1981b: A quantitative analysis of the relationships between O₃ sorption and its acute effects on plant leaves using image instrumentation. *Environ. Control. Biol.*, **19**, 85-92.
- Omasa, K., Hashimoto, Y. and Aiga, I., 1983: Observation of stomatal movements of intact plants using an image instrumentation system with a light microscope. *Plant Cell Physiol.*, **24**, 281-288.
- Omasa, K., Hashimoto, Y., Kramer, P. J., Strain, B. R., Aiga, I. and Kondo, J., 1985: Direct obser-

- vation of reversible and irreversible stomatal responses of attached sunflower leaves to SO_2 . *Plant Physiol.*, **79**, 153–158.
- 大政謙次・近藤矩朗・井上頼直(編), 1988: 植物の計測と診断. 朝倉書店.
- Omasa, K. and Onoe, M., 1984: Measurement of stomatal aperture by digital image processing. *Plant Cell Physiol.*, **25**, 1379–1388.
- Raschke, K., 1979: Movements of stomata. In *Encyclopedia of Plant Physiology*. (New Series) Vol. 7. (ed by W. Haupt and M. E. Feinleib). Springer-Verlag, Berlin, 382–441.
- Schulte-Hostede, S., Darrall, N. M., Blank, L. W. and Wellburn, A. R. (eds), 1988: *Air Pollution and Plant Metabolism*. Elsevier Applied Science, London, 381p.
- Sestak, Z., Catsky, J. and Jarvis, P. G. (eds), 1971: *Plant Photosynthetic Production: Manual of Methods*. Dr. W. Junk N. V. Publishers The Hague, 818p.
- Unsworth, M. H. and Ormrod, D. P. (eds), 1982: *Effects of Gaseous Air Pollution in Agriculture and Horticulture*. Butterworth Scientific, London, 532p.
- William, E., 1988: Stomatal responses to SO_2 and O_3 . In *Air Pollution and Plant Metabolism*. (ed by S. Schulte-Hostede, N. M. Darrall, L. W. Blank and A. R. Wellburn). Elsevier Applied Science, London, 255–271.
- Zeiger, E., Farquhar, G. D. and Cowan, I. R. (eds), 1987: *Stomatal Function*. Stanford Univ. Press, Stanford, 503p.