

非破壊顕微画像計測法による根の吸水機能変化 に対する気孔とその周辺細胞の反応の検討

大政 謙次*・丸山 幸夫**

(* 国立公害研究所
** 農業生物資源研究所)

Study on Changes in Stomata and their Surrounding Cells
Using a Nondestructive Light Microscope System: Responses
to Changes in Water Absorption Through Roots

Kenji OMASA* and Sachio MARUYAMA**

(* The National Institute for Environmental Studies,
Tsukuba 305, Japan
** National Institute of Agrobiological Resources,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan)

The effects of water stress on stomatal aperture and epidermal cells of attached sunflower leaves were observed with a remote-control light microscope system. The relationships between stomatal movements and changes in water potential, turgor potential and osmotic potential of attached leaves were examined.

The leaf water deficit was caused by ice water perfusion to roots and the recovery was performed by 20°C water perfusion. After the ice water perfusion the stomata immediately opened with severe turgor loss and hollow of epidermal cells, and then it rapidly closed. The severe water deficit (leaf water potential: -0.5 to -1.3 MPa) produced complete closure of stomata but the slight water deficit (-0.5 to -0.8 MPa) caused incomplete closure and immediate recovery after 20°C water perfusion. The hollow of epidermal cells indicated a time point of 0 MPa turgor potential.

Changes in leaf water potential above -0.8 MPa during water deficit and its recovery were regulated by turgor potential and those below -1.0 MPa were caused by osmotic potential. In the range of -0.5 to -0.7 MPa leaf water potential and 0.4 to 0.15 MPa leaf turgor potential, the stomatal movements were controlled by changes in turgor potential in epidermal cells as well as that in guard cells relating to K^+ transport.

The results of these experiments indicate the necessity of continuous observation of individual stomata by the microscope under the measurement of water potential, turgor potential and osmotic potential to understand the effects of water stress on stomatal behavior.

Key words: Light microscope, Nondestructive instrumentation, Soil temperature, Stomatal response, Water stress.

キーワード: 気孔反応, 光学顕微鏡, 土壌温度, 非破壊計測, 水ストレス

1. はじめに

植物は、自らの生存のために、根から水を吸水し、気孔を介して大気に水蒸気として放出している。根からの

吸水が遮断されると、植物体内が水欠乏(水ストレス)の状態になり、種々の生理機能に影響が生じる(Kozłowski, 1968–1981; Kramer, 1983)。しかし、気孔は、水ストレスに対して敏感に反応し、体内の水分状態を適切な状態に維持する機能をもっている(Davies *et al.*, 1981; Schulze *et al.*, 1987)。

水ストレスに対する気孔反応は、水ストレスが植物体内の水ポテンシャルや種々の生理機能に影響を与え、その後、その影響によって気孔が反応する機能(Feedback mechanism)と、湿度に対する反応のように、湿度変化が、直接、気孔反応を引き起こすという機能(Feedforward mechanism to humidity)がある(Farquhar, 1978; Raschke, 1979; Schulze *et al.*, 1987)。しかし、Whole plantでの気孔の開閉には、これらの機能が複雑に作用しており、湿度変化に対する気孔反応一つとってみても、生理機能の影響を示唆する報告も最近なされている(Shackel and Brinckmann, 1984; Schulze, 1986)。また、根の水分状態が気孔反応(あるいは葉のコンダクタンス)を制御する機構は明らかにされていない(Schulze, 1986)。それゆえ、水ストレスに対する気孔の開閉機構を明らかにするためには、生育している植物を用いた個々の気孔の非破壊計測と種々の生理機能や水ポテンシャル等の測定による検討が必要である。

ここでは、先に報告した遠隔操作が可能な光学顕微鏡システム(Omasa *et al.*, 1983; 大政, 1990)を用いて、根の吸水機能の変化に伴う生育している植物の気孔反応や周辺の細胞変化の非破壊計測を行い、葉の水ポテンシャルや圧ポテンシャルなどとの関係について検討した。

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)で、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10cm, 高さ20cm)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で一定に保った。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当り3g))で灌水した。

2.2 実験方法

気孔の観察は、光学顕微鏡本体を人工光型グロースチャンバ(相賀ら, 1982)内に入れ、生育環境下での気孔反応の直接観察を目的として開発した遠隔操作の光学顕微鏡システム(Omasa *et al.*, 1983; 大政, 1990)を用いて行った。実験材料を、制御温室からグロースチャンバに移し、温室内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、水ストレス処理を行い、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_l (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。水ストレスは、ポットに氷水を与え、急激に根の吸水を遮断することにより生じさせた。また、水ストレスを回復させるために、ポットに貯った水を取り除き、20℃の水を根に与えた。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。

水ポテンシャル(Water potential)の測定は、リーフディスクパンチ(直径18mm)を用いて葉片を切り取った後、即座にサンプルチャンバに入れ、等圧熱電対湿度計(Isopiestic thermocouple psychrometer)(Boyer and Knippling, 1965)で行った。水ポテンシャルの測定の後、葉片を凍結して細胞膜を崩し、融解後の組織の水ポテンシャルを同様な方法で測定して浸透ポテンシャル(Osmotic potential)を得た。圧ポテンシャル(Turgor potential)は、水ポテンシャルから浸透ポテンシャルを差し引くことによって計算した。

氷水処理後の水ポテンシャル等の経時変化の測定は一枚の葉において行った。水ポテンシャル等の測定値への葉片採取の影響を小さくするために、最初、まず葉の先端から葉片を採り、徐々に葉柄の方に採取位置をずらした。

3. 実験結果

3.1 水ストレス下での葉の水ポテンシャル、浸透ポテンシャル、圧ポテンシャルの変化

Fig.1は、氷水処理によって根の吸水機能を低下させ

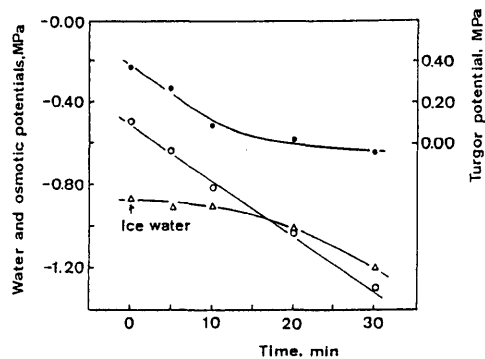


Fig. 1. Typical changes in water potential, turgor potential and osmotic potential of an attached sunflower leaf during ice water perfusion. ○: water potential; ●: turgor potential; △: osmotic potential. Environmental conditions: air temperature = 25.0℃; humidity = 60%RH; light intensity = 600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

た時の葉の水ポテンシャル、浸透ポテンシャル及び圧ポテンシャルの経時変化である。水ポテンシャルは、処理時間の経過に伴い、直線的に低下した。この水ポテンシャルの低下は、処理後10分までは圧ポテンシャルの低下速度と一致した。しかし、圧ポテンシャルは、その後0MPaに近づくに伴い低下速度が小さくなった。浸透ポテンシャルは、処理直後には一定であったが、10分を経過したあたりから徐々に低下し始め、20分以降は、水ポテンシャルの低下速度と一致した。この結果は、水処理による葉の水ポテンシャルの低下が、処理後10分は圧ポテンシャルの低下により、また、10~20分に

けては、圧ポテンシャルと浸透ポテンシャルの双方の低下により、さらに、20分以降は浸透ポテンシャルの低下により生じることを示している。

Fig.2は、複数の葉の水ストレス下での水ポテンシャルと浸透ポテンシャルあるいは圧ポテンシャルとの関係を示す。水ポテンシャルが-0.8MPa以上の場合には、水ポテンシャルの低下が圧ポテンシャルの低下に依存し、-1.0MPa以下の場合には、浸透ポテンシャルの低下に依存することを示している。なお、圧ポテンシャルが0MPaになるのは、水ポテンシャルが約-1.0MPaの時であり、Fig.1の水処理では、約20分経過した時点

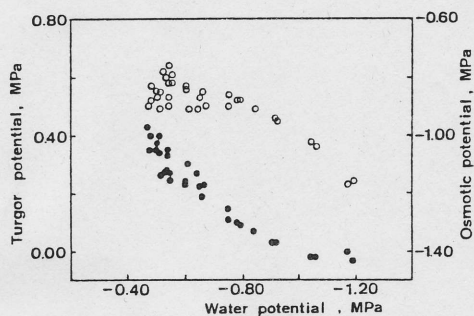


Fig. 2. Relationships between water potential, turgor potential and osmotic potential of attached sunflower leaves. ●: turgor potential; ○: osmotic potential. Environmental conditions were the same as those in Fig. 1.

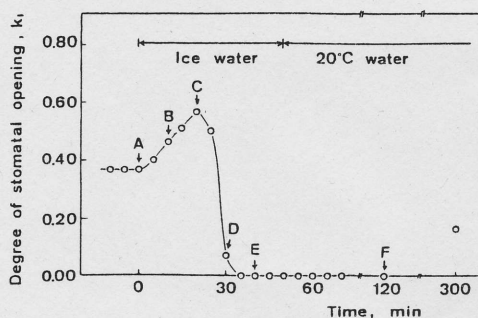


Fig. 3. Typical responses of an intact stoma of attached sunflower leaf to severe water deficit. The water deficit was caused by ice water perfusion to roots. Environmental conditions were the same as those in Fig. 1.

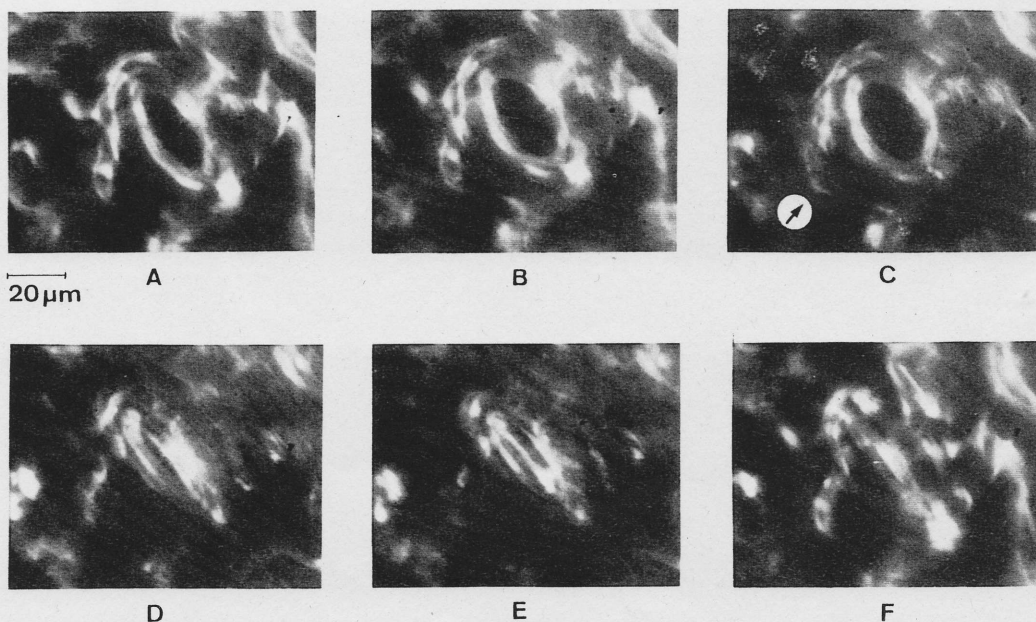


Fig. 4. Photomicrographs of the stoma shown in Fig. 3. (A) to (F) correspond to time points (A to F) in Fig. 3. The arrow (→) in "C" indicates first hollow of subsidiary cell.

であった。

3.2 水ストレスに伴う気孔反応と周辺細胞の変化

Fig. 3は、氷水によって根の吸水機能を急激に低下させた時の気孔開度の経時変化である。また、Fig. 4は、その典型的な時点(A~F)における顕微鏡写真である。

根に氷水を与えると、即座に気孔が開き始め(A→C)、20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陥没が観察され始めた。その後、陥没の程度の増大に伴い、気孔が急激に閉口し、孔辺細胞も膨潤さを失った(C→E)。この時、葉に萎れが観察された。氷水処理の後、50分経過した時点で、ポットの氷を除去し、20℃の水を灌水した。1時間程度経過すると、葉の萎れがもとの状態に回復し、細胞も膨潤さを取り戻した(F)。その後、2時間程度経過して、気孔が開きはじめ、3時間後には、氷水処理の前の約半分の気孔開度まで回復した。

Fig. 5は、極短時間の氷水処理と20℃の水処理の繰り返しによる気孔反応の例である。また、Fig. 6は、その典型的な時点(A~F)における顕微鏡写真である。最初の10分間の氷水処理において、Fig. 3, 4に示した50分間の氷水処理の場合と同様、気孔の一時的な開口(A→B)と、その後の急激な閉口(B→C)が観察された。しかし、完全な気孔閉鎖には至らず、20℃の水処理の後、20分程度で徐々にではあるが気孔が開き始めた。

この状態で、5分間の氷水処理を行うと、その程度は小さいが、一時的な開口(D→E)とその後の閉口(E→F)が観察された。しかし、全体としての気孔の開口基調は変わらなかった。なお、実験の間、細胞陥没などは観察されなかった。この結果は、細胞陥没、すなわち、萎れに至らない程度の水ストレスでも気孔は、複雑に開閉運動を繰り返すことを示している。この程度の水ストレスの変化は、日常の生育環境において、頻繁に発生する。

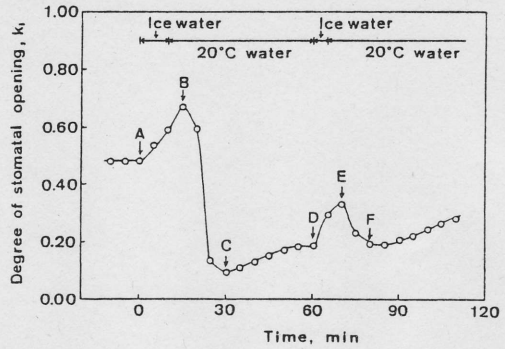


Fig. 5. Typical responses of an intact stoma of attached sunflower leaf to repetition of ice water perfusion to roots and 20°C water perfusion. The slight water deficit was caused by the ice water perfusion and the recovery was performed by the 20°C water perfusion. Environmental conditions were the same as those in Fig. 1.

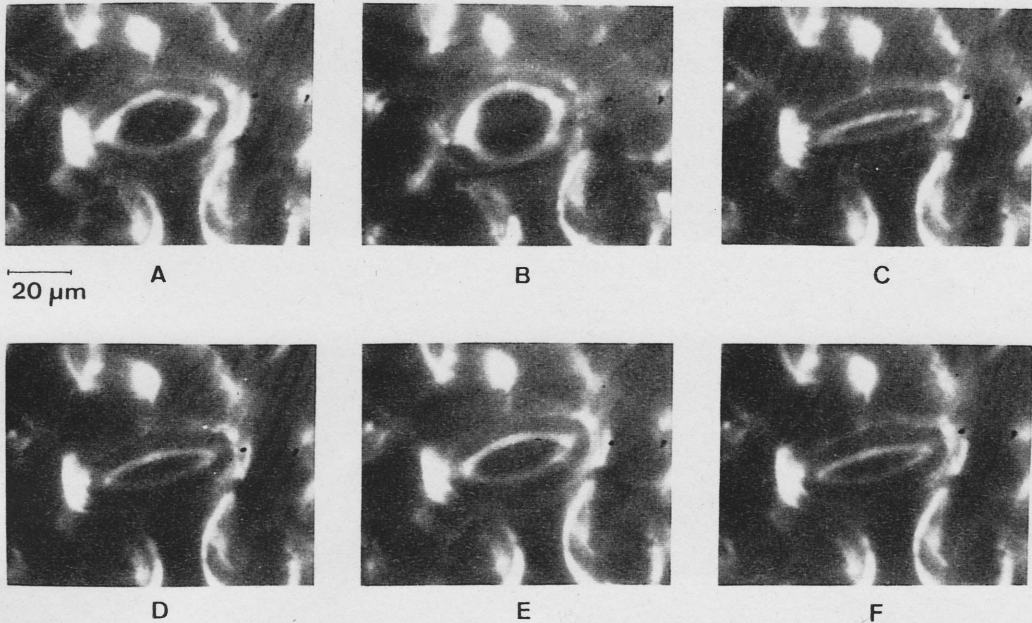


Fig. 6. Photomicrographs of the stoma shown in Fig. 5. (A) to (F) correspond to time points (A to F) in Fig. 5. During the experiment, the guard and epidermal cells maintained normal turgor.

4. 考 察

気孔は、通常、孔辺細胞の圧ポテンシャルが増加すると開き、減少すると閉じる。Fujino (1967)は、気孔の開口、すなわち、周辺の細胞から孔辺細胞への水の移動による圧ポテンシャルの増加が、 K^+ の孔辺細胞への蓄積と密接に関係していることを見いだした。現在、 Na^+ が作用する一部の塩性植物を除いて、この関係が一般に認められている。最近、この水ポテンシャル差に逆らった K^+ の輸送が、 H^+ の放出と関連し、孔辺細胞内のミトコンドリアの酸化的リン酸化反応やクロロフィルの光リン酸化反応によるATPをエネルギーとした反応に関与することが明らかになった。そして、孔辺細胞と周辺の細胞を隔てる原形質膜に存在する K^+ -イオンチャンネル通しての K^+ の選択的な輸送にこのエネルギーが使われると考えられている(Schroeder *et al.*, 1984; Zeiger *et al.*, 1987)。現在、気孔生理学の分野では、気孔開閉に対する種々の環境変化や植物ホルモンなどの効果、例えば、青色光、赤色光、低 CO_2 などによる開口効果やABA (Abscisic acid)、 Ca^{2+} 、高 CO_2 などによる閉口効果などを統一した理論(例えば、 K^+ -シングルイオンチャンネルへの寄与)に基づいて整理する方向で研究が進められている(島崎, 1986; Zeiger *et al.*, 1987)。

一方、孔辺細胞の周辺の細胞の圧ポテンシャルの変化も気孔開度に影響を与える(Positive feedback mechanism)(Cowan, 1972; Raschke, 1979)。氷水処理により生じた水ストレスは、孔辺細胞よりも先に周辺の細胞に圧ポテンシャルの減少を引き起こし、孔辺細胞と周辺の細胞の圧ポテンシャルのバランスを崩し、気孔の一時的な開口を生じさせたと考えられる(Fig. 3~6)。Fig. 2によれば、水ポテンシャルで -0.8 MPa、圧ポテンシャルで 0.1 MPa以上(氷水処理時間で10分以下)の時には、水ストレスによる葉の水ポテンシャルの低下が、葉の圧ポテンシャルの低下として現れるので、根の機能の回復に伴って気孔開度も迅速に回復した。特に、5分間の氷水処理(Fig. 5 and 6, D→F)の場合には、この現象が顕著に現れた。これは、この程度の水ポテンシャル変化($-0.5 \sim -0.7$ MPa; 圧ポテンシャルで $0.4 \sim 0.15$ MPa)においては、孔辺細胞の K^+ 濃度の調節だけでなく、周辺の細胞の圧ポテンシャル変化によっても気孔の開閉が制御可能であり、適度な水ストレスは気孔の開口作用をもつことを示している。そして、気孔の最大開度が、適度な水ストレス状態で観察されるというGlinka (1971)やEdwards *et al.* (1976)の葉片を用いた実験結果が、個体を用いた実験でも再現できることを示唆している。

20分程度の氷水処理で周辺細胞に陥没が生じるが(Fig. 3 and 4 C)、これは、葉の圧ポテンシャルが 0 MPaになった時点(Fig. 1 and 2)と一致する。このことは、光学顕微鏡システムを用いた細胞観察により、葉の圧ポテンシャルが 0 MPaになった時点を知ることができることを意味する。圧ポテンシャルが 0 MPaに近づくと、浸透ポテンシャルも徐々に低下するので、生体防御のための気孔開口の後の急激な閉口が発生する。このため、細胞組織が、不可逆的な損傷を受けず、水ストレスが解消した数時間後には、気孔が再び開き始める。水ストレス下での気孔の閉口の原因については、正確にはわかっていないが、ABAの効果による孔辺細胞からの K^+ の積極的な放出によるという説が有力である(Ehret and Boyer, 1979; Raschke, 1979, 1987)。しかし、細胞の浸透ポテンシャルの変化に伴う他の生理機能変化の影響や水ストレスによる孔辺細胞の直接的な圧ポテンシャルの低下などもその原因として考えられる。気孔閉鎖の要因が生理的要因によることは、細胞陥没が回復した後、すなわち、葉の圧ポテンシャルが回復した後も気孔開度の回復が約2時間遅れたことから推察される。

根の吸水機能の低下による水ストレスは、下位葉や蒸散の活発な葉から進行する。また、水ストレスに対する気孔反応は、一枚の葉でも部位により異なる複雑な挙動を示す(Hashimoto *et al.*, 1984)。今後、生育環境下での葉位や部位により異なる気孔の挙動を通導器官や細胞構造と関連づけた水ストレス状態との関係から検討する必要がある。また、生育環境下での水ストレスに対する気孔反応の原因を圧ポテンシャルの直接的な影響と生理的な影響にわけて整理し、最大開度になる水ストレス状態や環境条件を生育している植物で明らかにしていく必要がある。

5. ま と め

ここでは、生育している植物の根に、吸水遮断のための氷水や吸水機能の回復のための $20^\circ C$ の水を与え、その後の気孔反応と周辺の細胞の変化を遠隔操作が可能な光学顕微鏡システムを用いて観察した。また、葉の水ポテンシャル、圧ポテンシャル、浸透ポテンシャル等との関係を調べた。その結果、根の吸水機能の遮断や回復処理によって、即座に気孔開度が変化することがわかった。特に、根の吸水遮断によって、気孔の一時的な開口とその後の閉口が生じるが、その間、葉の水ポテンシャルが一定の速度で低下し、水ポテンシャルが -0.8 MPa以上の場合には、圧ポテンシャルの低下に、 -1.0 MPa以下の場合には、浸透ポテンシャルの低下に依存することがわかった。また、細胞陥没の観察により、葉の圧ポテン

シャルが0 MPaになる時点を知ることができることがわかった。さらに、水ポテンシャルの変化が圧ポテンシャルの変化に依存する範囲では、孔辺細胞の K^+ 濃度の調節だけでなく、周辺の細胞の圧ポテンシャル変化によっても気孔の開閉が制御可能であり、生育状態の植物でも適度な水ストレスが気孔の開閉作用をもつことが示唆された。

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.
- Boyer, J. S. and Knipling, E. B., 1965: Isopiestic technique for measuring leaf water potentials with a thermocouple psychrometer. *Proc. Acad. Sci. Soc. USA*, **54**, 1044-1051.
- Cowan, I. R., 1972: Oscillations in stomatal conductance and plant functioning associated with stomatal conductance: Observations and a model. *Planta*, **106**, 185-219.
- Davies, W. J., Wilson, J. A., Sharp, R. E. and Osonubi, O., 1981: Control of stomatal behaviour in water-stressed plants. In *Stomatal Physiology* (ed. by P. G. Jarvis and T. A. Mansfield), Cambridge University Press, Cambridge, 163-185.
- Edwards, M., Meidner, H. and Sheriff, D. W., 1976: Direct measurements of turgor pressure potentials of guard cells. *J. Exp. Botany*, **27**, 163-171.
- Ehret, D. L. and Boyer, J. S., 1979: Potassium loss from stomatal guard cells at low water potentials. *J. Exp. Botany*, **30**, 225-234.
- Farquhar, G. D., 1978: Feedforward responses of stomata to humidity. *Aust. J. Plant Physiol.*, **5**, 787-800.
- Fujino, M., 1967: Role of adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in stomatal movements. *Sci. Bull. Fac. Educ. Nagasaki Univ.*, **18**, 1-47.
- Glinka, Z., 1971: The effect of epidermal cell water potential on stomatal response to illumination of leaf discs of *Vicia faba*. *Physiol. Plant*, **24**, 476-479.
- 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.
- Kozlowski, T. T. (ed.), 1968-1981: *Water Deficits and Plant Growth*. Vol. I-VI. Academic Press, New York.
- Kramer, P. J., 1983: *Water Relations of Plants*. Academic Press, New York, 489p.
- 大政謙次, 1990: 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。農業気象, **45**, 251-257.
- 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.
- 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, 383-441.
- Raschke, K., 1987: Action of abscisic acid on guard cells. In *Stomatal Function* (ed. by E. Zeiger, G. D. Farquhar and I. R. Cowan), Stanford University Press, Stanford, 253-279.
- Schroeder, J. I., Hedrich, R. and Fernandez, J. M., 1984: Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, **312**, 361-362.
- Schulze, E.-D., 1986: Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **37**, 247-274.
- Schulze, E.-D., Turner, N. C., Gollan, T. and Shackel, K. A., 1987: Stomatal responses to air humidity and to soil drought. In *Stomatal Function* (ed. by E. Zeiger, G. D. Farquhar and I. R. Cowan), Stanford University Press, Stanford, 311-321.
- Shackel, K. and Brinckmann, E., 1984: In-situ measurement of epidermal cell turgor, leaf water potential and gas exchange in *Tradescantia virginiana* L. *Plant Physiol.*, **78**, 66-70.
- 島崎研一郎, 1986: 気孔開閉と孔辺細胞の生理。化学と生物, **24**, 645-654.
- Zeiger, E., Farquhar, G. D. and Cowan, I. R. (eds.) 1987: *Stomatal Function*. Stanford Univ. Press, Stanford, 503p.