

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660277

研究課題名(和文)植物気孔形態の可変性：何のために変化するのか？

研究課題名(英文)Morphological plasticity of plant stomata: Why do they change?

研究代表者

矢野 勝也 (Yano, Katsuya)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：00283424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：成熟葉が経験した生育環境に応じて新葉の気孔形態が変化する。この意義を「成熟葉のRubisco-CO₂需要バランスを是正するために新葉の気孔形態が変化する」という仮説から検証した。栄養欠乏・CO₂富化で古葉でのRubisco-CO₂需給バランス(光合成産物の13C/12C比)が変化し、その変化が対象葉の13C/12C比に反映される。この変化と気孔形態との相関を調査した。オオムギ・ダイズ・ハツカダイコン・ソルガムを用い、窒素やリンを欠如させる処理区を設けた。どの植物種も栄養欠乏に陥るほど気孔密度は増加する点は共通していたが、13C/12C比と気孔形態の相関は常に有意というわけではなかった。

研究成果の概要(英文)：Stomatal morphology of new leaves is changed in accordance with the growth environment in which the mature leaves encountered. I tested a hypothesis such stomatal changes in new leaves have a significance to rectify the Rubisco-CO₂ demand-supply balance in mature leaves. The Rubisco-CO₂ demand-supply balance affects 13C / 12C ratio of photosynthetic products and is reflected to the ratio in the younger leaves. The correlation was investigated between the ratio and stomatal morphology. Using barley, soybean, radish and sorghum, full nutrients, N- and P- treatments were prepared. There was a common property among all the plant species that stomatal density increased with nutritional deficiencies. However, the correlation between 13C / 12C ratio and stomatal morphology was not always significant.

研究分野：作物生態生理

キーワード：気孔 リン 窒素 二酸化炭素 炭素同位体比

1. 研究開始当初の背景

植物の気孔密度(単位葉面積当たりの気孔数)がCO₂濃度や遮光、土壤水分などで変化することは知られていた。それに加えてP栄養でも変化することを申請者らは新たに見出した(Sekiya & Yano 2008, *New Phytol* 179, 799)。P栄養は単独で影響するだけでなく、CO₂濃度や土壤水分とも強く相互作用して非常に複雑な応答を示した。しかし、一見複雑な応答であっても葉の炭素同位体比(¹³C/¹²C)とは相関関係がみられた。すなわち、上位葉の¹³C/¹²C比が低いと上位葉の気孔密度は低く、逆に¹³C/¹²C比が高いと気孔密度は高くなった。

自然界には、¹²CO₂(98.89%)だけでなく¹³CO₂(1.11%)もわずかに存在する。上位葉組織の¹³C/¹²C比は下位葉の光合成能(Rubisco活性と葉内CO₂の需給バランス)を反映していると思われる。というのは、上位葉炭素の大部分はその葉が生産したのではなく、下位葉の光合成産物に由来するからである。一般的にC3植物では、Rubisco活性に対してCO₂供給が過剰な条件で生産された糖の¹³C/¹²C比は低下し(¹²Cリッチな糖)、逆にCO₂供給不足の条件では¹³C/¹²C比は増加する(¹³Cリッチな糖)。したがって上記網かけ部は、下位葉でCO₂過剰だった場合(=上位葉¹³C/¹²C比が低い)に新たに発生する上位葉の気孔密度は低下し、逆に下位葉でCO₂不足の場合(=上位葉¹³C/¹²C比が高い)に上位葉の気孔密度は増加したと解釈できる。

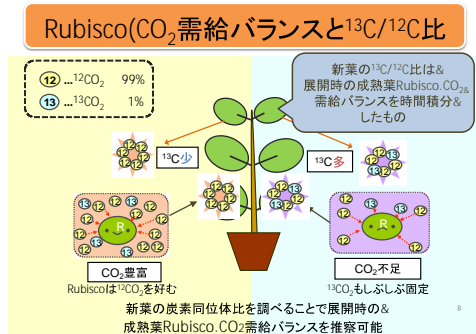
2. 研究の目的

結局、CO₂濃度や土壤水分、P栄養状態の差異はすべて葉の光合成能(Rubisco-CO₂需給バランス)の差異に集約され、それが光合成産物の¹³C/¹²C比(=上位葉組織の¹³C/¹²C比)に記録されているのではないか。種々の環境条件の変動で上位葉の気孔密度が変化するのは、下位葉が感知したCO₂過不足を是正するためなのではないか。もしこの仮説が妥当であるならば、種々の環境変動を越えて、葉身¹³C/¹²C比と気孔形態の間に一定の相関が存在するはずである。そこで、CO₂濃度や養分レベルを変えて生育させた植物で葉身¹³C/¹²C比と気孔形態の相関を調査し、その相関の普遍性を確認することで仮説の妥当性を検証する。

3. 研究の方法

1) 供試植物種と栽培方法

実験に用いた植物は、ダイズ *Glycine max* L. (cv. フクユタカ)、オオムギ *Hordeum vulgare* L. (cv. シュンライ)、ソルガム *Sorghum bicolor* L. (cv. マイロソルゴー)、ハツカダイコン *Raphanus sativus* L. var. *sativus* (cv. パードランド)の4種であった。それぞれの種子を、濾紙を敷いたシャーレに撒き水道水で湿らせた。これをクールインキュベーターを用いて暗所にて25℃で3日間静置して萌芽させた。栽培開始から13日目までの容器(水耕槽)は幅9.7cm、奥行き31.0cm、



深さ 9.5 cm のプラスチックケースをアルミ箔で包み遮光したものであった。この中に水耕液として 1/5 強度ホーグランド液を 2L 満たした。発泡スチロール様の厚さ 1.5cm 程の梱包材を容器の形に合わせて切り取り、フローターを作成した。このフローターに切れ込みを入れ、そこに発芽した種子をはさみ植えた後水耕槽に浮かべた。各容器には同種植物を 7~9 個体ずつ植え、一種につき一つの容器に植えた。これをグロースチャンバー内に置き、12時間日長、昼 30、夜 25、湿度 60%、光強度 100 ± 10 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD で水耕栽培した。エアレーションは AC エアポンプを用いて常時施した。途中生育の悪いものを間引いた。

植え付けから約 14 日後、1/5 強度ホーグランド液をそのまま継続する処理 (F 区)、リンを除去した処理 (P-)、窒素を除去した処理 (N-区) の 3 つの処理区を設けた。各条件に植え替えた。容器は内径幅 18.5 cm、奥行き 32.7 cm、深さ 14.6 cm のプラスチックコンテナで、通常のホーグランド液(5 倍希釈) (F 区)、各養分を欠乏させたホーグランド液(5 倍希釈) (P-区、N-区) 7L を満たした。各容器には植え替え前同様発泡スチロール様の梱包材を容器の形に合わせて切り取って作成したフローターを浮かべた。フローターに 4 か所切れ込みを入れ、各植物 1 個体、計 4 個体植えた。植え替え時、新鮮重を測定し、生育の良いもの、悪いものが同一処理区に偏らないよう配慮した。このうち半分の植物体は CO₂ 濃度を 800ppm に設定したグロースチャンバー内に置き、これを高 CO₂ 処理区とした。残り半分の植物体は CO₂ 濃度を設定していないグロースチャンバー内に置き、低 CO₂ 処理区とした。

栽培期間中は毎日、または 1 日おきに pH を 6.0 に調節した。調節に用いた試薬は 1.0M NaCl と 2.0M HCl であった。また、各処理区の環境条件が同一になるようにコンテナの位置を毎日、または 1 日おきに入れ替え、3~4 日ごとに 2 台のグロースチャンバー内の中身を入れ替えた。溶液は 1 週間に一度の頻度で交換した。

各処理区とも、ダイズ・オオムギ・ソルガムは植え付けから 29 日後、ハツカダイコン

は37日後に収穫し葉面積を測定した後、80で48時間乾燥させ、乾燥重を測定した。

2) 気孔密度・気孔指数

収穫直前、主茎の最上位完全展開葉（向軸側、背軸側）の表面にマニキュアを薄く塗布し、乾いた後セロハンテープを用いてマニキュアの剥片を葉身より回収した。そのままスライドガラスに貼り付けマニキュアサンプルを採取した。デジタルマイクロスコープを用い、1つのサンプルにつき向軸側、背軸側各3枚ずつ写真を撮影した。ただしサイズは背軸側に比べ向軸側にあまり気孔が見られなかったため背軸側のみを測定の対象とすることとした。各植物異なった面積（オオムギ：0.5mm×0.5mm、ダイズ：0.2mm×0.2mm、ダイコン：0.2mm×0.2mm、ソルガム：0.25mm×0.25mm）を測定範囲とした。その中にある一対の孔辺細胞からなる気孔の数、その他の表皮細胞の数（孔辺細胞は除く）をカウントした。測定は1枚の写真につき1区画、単子葉類であるオオムギとソルガムについては2区画行った。気孔指数は、範囲内の気孔数をその他の表皮細胞数（孔辺細胞は除く）と気孔数の合計で割ることで算出した。

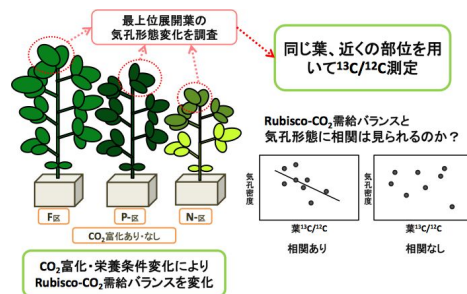
3) 孔辺細胞の長さ

気孔密度・気孔指数調査に用いたものと同じ写真を用いデジタルマイクロスコープを使用して、一対の孔辺細胞の長辺の長さを測定した。ただし形が曖昧なものは除外し測定の対象外とした。なるべく気孔密度・気孔指数の測定と同じ領域で測定するよう心がけたが、数が少なく困難であった場合はその近傍の孔辺細胞も対象とした。1枚の写真につき5~10個無作為に選択し、測定した。統計解析は1個体の平均値を取ってn=4とするのではなく、同じ処理区内の個体で測定された孔辺細胞をプールして行った(n=76-102)。

4) ^{13}C 分析

乾燥済みの各植物体最上位完全展開葉から30-70 μg 秤量し、錫カップに詰めた。カップ内に空気が混入していると測定誤差を生じるため、封をする際にはカップを丁寧に折りたたみ、内部の空気を極力抜くようにした。サンプルは全自動NCS分析装置を用いて完全に燃焼させ、全ての炭素を二酸化炭素にした後、元素分析計-IRMSインターフェイスを介して安定同位体比質量分析計へ導入し、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比（ ^{13}C ）を測定した。

C3植物では CO_2 と初めに反応する酵素Rubiscoが ^{12}C を選び好みするため、葉 ^{12}C の割合が大気中と比べ高くなる。しかしC4植物ではサイトゾルに溶解した HCO_3^- がPEPカルボキシラーゼにより触媒され、Rubiscoに固定されるので ^{12}C 、 ^{13}C の分別が少ないことで知られている(Farquharら1989)。そのため、C3植物の傍らでソルガム等C4植物を生育させることで葉外 CO_2 の ^{13}C 比を推定すること



ができる。したがって、以下の式から葉外 CO_2 と比較してどの程度C3植物のRubiscoで分別が行われたかを簡易的に推定することが可能である(Marino and McElroy 1991; Polley et al., 1993; Hanba et al., 1997)。

$$= (\text{ソルガムの } ^{13}\text{C}) - (\text{その他の植物種の } ^{13}\text{C})$$

この式にあてはめることで、各C3植物の値を算出した。

4. 研究成果

各植物は植え替え後の環境変化に応じて明らかな成長の変化を示した。気孔指数の変化は種により異なったが、どの植物種も栄養欠乏に陥るほど気孔密度は増加して小さい孔辺細胞を形成する共通の傾向が認められた。そして、気孔密度と孔辺細胞の大きさには負の相関が認められた。

C4植物であるソルガム地上部の平均 ^{13}C 値は高 CO_2 区では $^{13}\text{C} = -24.09\text{‰}$ 、低 CO_2 区では $^{13}\text{C} = -12.99\text{‰}$ と約2倍の差があった。これは高 CO_2 区で用いた炭酸ガスの低い ^{13}C 値によるものと思われる。このソルガムの ^{13}C 値をチャンパー内空気 CO_2 の ^{13}C 値として、各植物種の値を算出した。

高 CO_2 処理区内では、いずれの植物種でもF区に比べN区の値は低下していた。ハツカダイコンではP区でも低下した。一方、低 CO_2 処理区内では養分欠乏による大きな差異は見られなかった。この測定結果より、主に高 CO_2 環境下では栄養が欠乏するほどRubisco活性に対し CO_2 が不足した状況に陥っていたことが推察される。

また、値と気孔密度の間には有意な負の相関があり、Rubisco活性に対し CO_2 が不足するほど上位葉気孔密度が増加した。これは仮説を支持する結果であったが、低 CO_2 区に比べ高 CO_2 区の栄養欠乏区で値が大きく減少しており、高 CO_2 ・栄養欠乏環境下での植物の相対的な CO_2 不足を示唆した。先行研究や本実験のデータからはこの現象を説明できず、この原因は高 CO_2 ・低 CO_2 区でチャンパー内 CO_2 の ^{13}C が異なっており、低 CO_2 条件で固定された低い ^{13}C の光合成産物が葉の黄化の際に上位葉へ移動したためだと考えた。そこで栽培当初から CO_2 処理を施し、下位葉と上位葉の ^{13}C の差をなくした。すると気孔密度と値の間に有意な相関は確認されなかった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 勝也 (YANO Katsuya)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：00283424

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：