

# 植物の刺激応答を利用した環境ストレスの早期検出

林 健司・浜田 和明・北 佳子\*

(受理 平成6年5月31日)

## Early Detection of an Environmental Stress of Plants Using Stimulus Responses

Kenshi HAYASHI, Kazuaki HAMADA and Yoshiko KITA

Responses to stimuli were investigated to detect environmental stress in plants. We analyzed the light and electric stimuli/responses of a pumpkin. The optical method was used to measure the fluorescence of chlorophyll. It was found that the time-course of fluorescence change, *i.e.*, fluorescence induction phenomena, were affected by water stress. The electric responses, where electric stimulus induced action potential in stem, disappeared by water stress. The detecting time for the two methods was within 3 hours; the periods were very short compared with a detecting method using human sight.

### 1. はじめに

現在、植物は食料源、地球環境の保全・浄化能力、環境汚染の指標生物としてその重要度が増しているにも関わらず、砂漠化、環境の悪化、開発などによりその数を激減させている。このような状況にあって、植物の状態を診断、計測することは重要であるが、その技術の発達は非常に遅れている。植物の健康状態の診断は外視的方法や生化学的方法などがある<sup>1,2)</sup>。前者は状態変化の検出が遅い、経験を要する、自動化が困難であるという点で、後者は対象を破壊する、検出領域が狭いといった点で問題がある。

本研究では植物に積極的に刺激を与え、応答を引き出す刺激応答を植物の診断方法として検討した。ここで刺激とは植物の生命活動がある特定の変化を示す外部環境変化を指し、応答は植物体の特定の変化を指す。刺激応答は生物の最も生物らしい特徴の一つであり、その活動度を強く反映する可能性が高い。ここでは、光および電圧を刺激として選び、応答として葉緑体蛍光、活動電位を検出し、水ストレスを与えた場合の植物体の状態変化の計測を試みた。

### 2. 実 験

#### 2.1 材 料

実験材料である植物にはカボチャを用いた。実験に使用したカボチャは発芽後10日程度で、第1葉が十分生育した段階のものである。育種はインキュベータ内で行い、実験に使用する2日前に実験室に移し環境に適応させた。温度はいずれも28℃に保った。

#### 2.2 光刺激応答実験

図1(a)に光刺激実験の測定系を示す。150Wハロゲン光源からライトガイドで暗箱内に導いた光を溶液フィルタ(塩化コバルト10%エタノール溶液、3mm厚)を通して、カボチャ葉に照射する。フィルタを通し照射する光(励起光)は光合成を活用化する目的で500nm以下である<sup>3)</sup>。その際、葉緑体から出る蛍光(670-690nm)を干渉フィルタを通してCCDカメラ(日立KP-140)により画像として捉える<sup>4)</sup>。この画像をVTRに記録した後、画像入力ボード(マイクロテクニカ、MT9801FMM)により8ビット256階調でデジタル化し、デジタル値を50ms間隔でコンピュータに取り込み解析を行った。

\* 現松下電器産業(株)

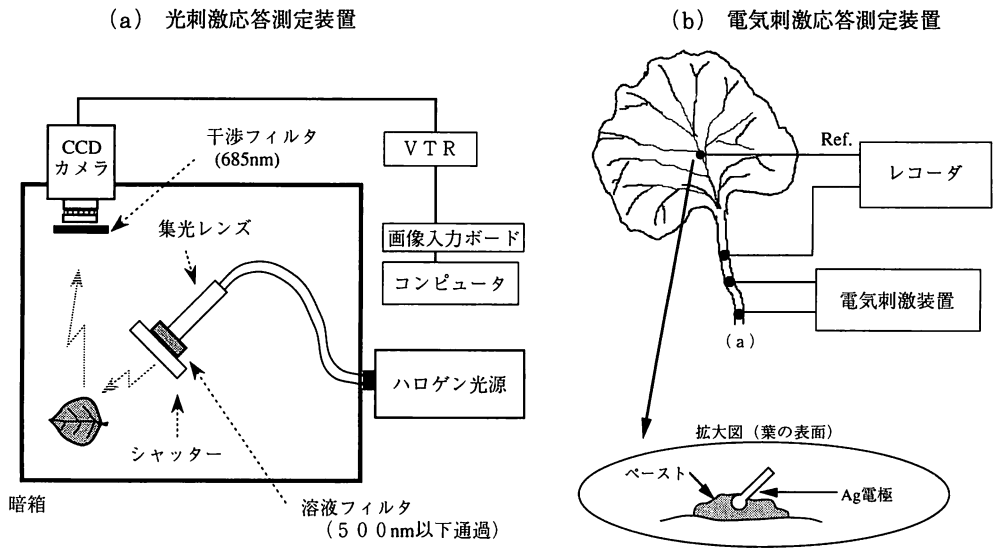


図1 光刺激応答および電気刺激応答の測定系

光刺激実験はカボチャを暗箱内に置き、30分間暗条件下で光合成を失活させた後、励起光をシャッターにより60秒間照射した。実験を繰り返す場合にはそのまま暗条件を保ち、30分おきに励起光の照射を行った。

### 2.3 電気刺激応答実験

電気刺激応答の測定系を図1(b)に示す。植物体に電気刺激を与え、電気的な応答を検出するために、植物用ペーストにより植物体と電極間の電気的な接続を行う。ペーストは10mM KCl水溶液40ml、可溶性デンプン10g、グリセリン10mlを混合したものである<sup>9)</sup>。電極は先端を熱で丸く加工したAg線(直径0.5mm)を用いた。

電気刺激は20Vで充電したキャパシタ(10 $\mu$ F)を300ms間植物体側につなぐことで印加した。刺激電極(正負1対)は茎(葉柄)の根側に5mm間隔で装着した。

電気応答は植物体表面に取り付けられた電極により外部誘導して検出した。電極位置は刺激電極から葉側に5mmの点とした。電位は葉上の電極を基準とし、高入力インピーダンスのアンプを通してレコーダで記録した。この場合、葉上の電位は電気刺激により短時間では変化しないので、測定された電位は茎の点での内部電位の変化に対応すると考えられる。また、実験はペースト装着後、電位を安定化させるため30分静置し

た後開始した。

### 2.4 水ストレス

植物の内部状態を変化させる環境ストレスには様々なものがあるが、本研究では植物に与えるストレスとして水ストレスを選んだ。水ストレスは、植物が浸透圧変化により根からの水吸収を妨げられることにより生じる<sup>9)</sup>。ここでは300mMしょ糖溶液に根の周囲を置き換えることでストレスを与えた。また、対照実験としてしょ糖溶液の代わりに精製水を与えたカボチャを使用した。

## 3. 光刺激応答による水ストレスの検出

### 3.1 葉緑体蛍光

図2に暗状態から突然光を照射した場合の蛍光強度の時間変化および葉の蛍光像を示す。蛍光強度は光合成の活性化の段階に応じ、時間と共に過渡的に変化する。この変化はクロロフィル誘導期現象と呼ばれる。蛍光強度の最大値をP、その後続く極小、極大点をS<sub>1</sub>、M<sub>1</sub>と呼ぶ。蛍光強度はその後ゆっくりと変化を繰り返し、定常値に達する。このような時間変化は光合成システムの内部物質の濃度や活性の変化、膜電位変化により生じる<sup>3,7)</sup>。

同じく図2に示した画像は、誘導期現象のPとM<sub>1</sub>における葉の蛍光像である。本測定システムにより葉

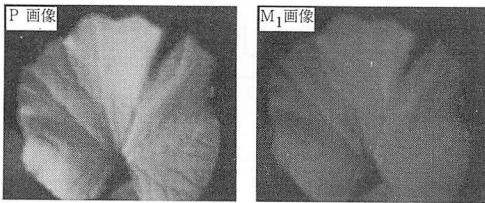
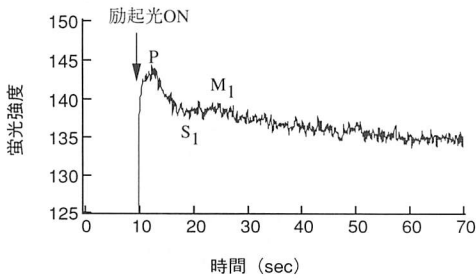


図2 蛍光誘導期現象

画像は上図P点とM<sub>1</sub>点でデジタル化されたもの

の蛍光強度の変化を2次元の像として計測できることがわかる。

### 3.2 時定数の推定

測定された蛍光強度は、光照射、葉の表面の状態などで変化するため、絶対値は重要でなく相対的な変化が意味を持つと考えるべきである。例えば図2の蛍光像の葉の部域による明るさの違いが葉の内部状態の差に対応するわけではない。特に葉表面の汚れなどはフィールドでの実験を想定した場合は不可避であり、蛍光強度そのものを活性度計測の指標に用いることはできない。

そのため、本研究では強度変化の時定数を推定し、指標とした。図3はPからS<sub>1</sub>への変化を指数関数を仮定してカーブフィットさせたものである。パラメータの推定はマルカート法により行った<sup>8)</sup>。推定誤差は10%程度であった。蛍光誘導期現象は異なる時定数の要素が組み合わされたシステムで表現されるが、その場合、PからS<sub>1</sub>への変化は蛍光の立ち上がりから考えると4番目の要素なり、 $\tau_4$ と記述される。

この他に、蛍光像の強度変化から得られる指標にP点での強度をS<sub>1</sub>での強度で割った値などが考えられ、規格化された像を得ることができる。すなわち、P/S<sub>1</sub>像は明暗の差の小さい像となる。しかし、本研究ではストレスを与えた場合の変化が顕著であり、時

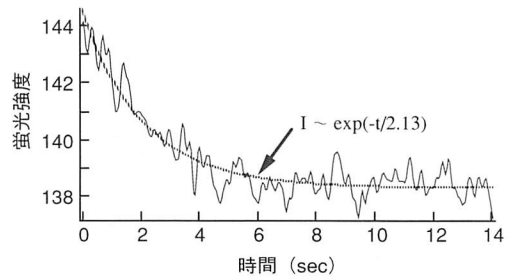


図3 蛍光変化のカーブフィット

図2におけるPからS<sub>1</sub>までの蛍光強度(I)の変化を指数関数で近似した。

間軸の情報を生かすことができるという点から、葉上の部域ごとの時定数を推定し、それを水ストレスの検出の指標とした。

### 3.3 水ストレスによる蛍光誘導期の変化

水ストレスを与えることにより蛍光誘導期現象は変化する。まず、ピークであるP点での蛍光強度が減少する。前述したように強度そのものは活性度の指標とはなり難い。また、強度の比は規格化された指標となり得るが、ここで述べる時定数変化に比べると変化は顕著ではなかった。

図4に時定数の変化を示す。葉の中心付近での16カ所での値を時間を追って示した。水ストレスはt=0hの時点で与えた。この結果では水ストレスを与えた後、約3時間で時定数が顕著に変化し、水ストレスの影響が検出できた。同様の実験を繰り返した結果、検出は2~3時間程度で可能であった。

なお、図4において示した葉上の位置は1区画がデジタル化された画像では16×16ピクセルの幅を持っているが、時定数はそれらの平均値の時間変化から推定した。

## 4. 電気刺激応答による水ストレスの検出

### 4.1 電気刺激応答

生物が刺激に対して興奮性の応答を示すことは、動物の神経系において最も顕著である。そのような興奮性応答は神経、オジゴソウなど運動性を持った植物に限らず<sup>9,10)</sup>、広く生物において見ることができる。本研究において用いたカボチャも刺激に対して興奮性の電気応答を示す。

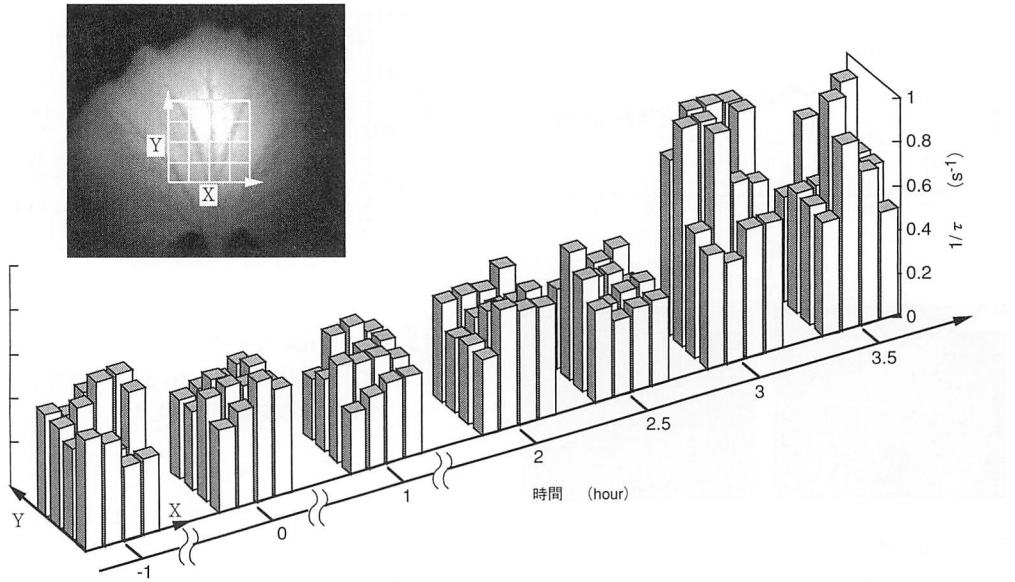


図4 水ストレスによる時定数の変化

画像は時定数を推定した葉上での位置を示す。水ストレスは0 hの時点で与えた。

図5は電気刺激応答波形の一例である。応答の振幅のばらつきは大きく、2~25mV程度であった。この電位は植物における電気現象の典型的な値である<sup>5,10)</sup>。この電気的な変化は測定点を変えるとピークが時間的にずれるため伝搬性の興奮現象である。応答の伝搬速度は3 mm/s程度であり、これも他の植物において得られた値と同程度である<sup>9,10)</sup>。また、カボチャにおいてはこのような刺激応答性は茎だけではなく葉においても見られたが、応答の大きさと再現性か

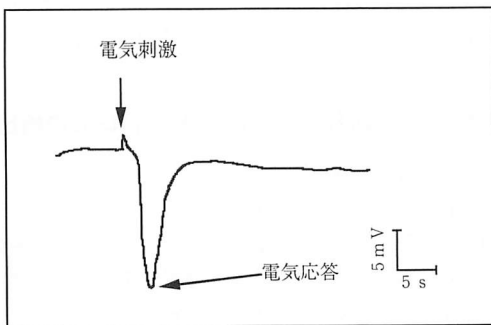


図5 茎における電気刺激応答

ら本研究では茎における電気刺激応答に関して水ストレスの影響を調べた。刺激応答から得る指標は、波形解析なども考慮すべきだが、ここでは伝搬速度と振幅のみとした。

なお、応答の不応期は2秒以下であり、連続的に刺激を与えても応答を観測することができた。さらに、電気刺激およびペーストが植物に与える影響は小さく、外視的に成長を与える影響は見いだせなかった。

#### 4.2 水ストレスによる電気刺激応答の変化

図6に示すのは水ストレスによる電気刺激応答の変化である。ストレスを与えた6例と対照実験として精製水を与えた場合を示した。電氣的刺激応答は水ストレスにより消失する。図では応答が消失した場合、伝搬速度、応答振幅いずれも0となることで表現されている。水ストレスの検出はばらつきは大きいものの2時間程度で可能であると思われる。対照区では、ペーストの乾燥により一度に測定できる時間が限られるが、ペーストや電気刺激により電氣的応答が消失することはなく、長時間に渡り応答を得ることができた。

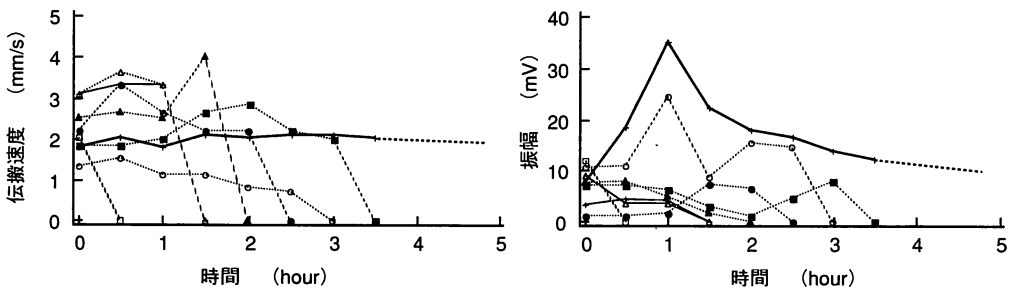


図6 水ストレスによる電気刺激応答の変化

6例について伝搬速度と振幅の変化を示した。水ストレスは0hの時点で与えた。伝搬速度と振幅が0となるのは応答が消失したことを意味する。実線は水ストレスを与えていない対照実験を示す。

## 5. 検 討

本研究では刺激応答により水ストレスの影響の検出を試みた。その結果、光刺激応答および電気刺激応答いずれも2～3時間程度でストレスを検出可能であった。外視的にはカボチャはこの時間では変化が無く、今回の刺激応答によりストレスの早期発見が可能であることがわかる。外視的な方法では、今回用いた水ストレスでは葉および茎がしおれてしまうまでに10時間～2日を要し、本方法が比較して十分に早期であることがわかる。

ここで刺激応答の変化の内部機構について少し考察しておく。電気刺激応答は植物の茎内部の導管側細胞膜電位の脱分極により生じていると考えられる。この膜電位は、木部柔組織における養分吸収、膨圧制御、運動性、情報伝搬と密接に関連している<sup>10)</sup>。水ストレスにより刺激応答が消失するのは、水の不足により木部柔組織の興奮性細胞が膨圧調整を果たせなくなったためであると考えられる<sup>9)</sup>。

一方、光刺激応答による変化の機構を説明することは蛍光誘導期現象が光合成システムが複雑であるため難しい。本研究において指標とした時定数はチラコイド膜のATPase活性、プロトン濃度差に関連していると考えられている<sup>7)</sup>。水ストレスにより、葉上の気孔の開閉、さらには水の不足により光合成システムそのものが影響を受けるため、蛍光誘導期現象も変化したものと考えられる。

最後に、本研究で用いた刺激応答の問題点を述べる。

まず、光刺激応答は非接触に対象を測定できるという点で優れている。しかし、葉緑体が存在する部位のみに測定箇所が限定される。また、光計測は本研究で行ったように画像計測とすることにより局所的な変化も検出可能である。例えば、図4に示した変化では、平均化しているため解像度は低いものの、葉脈付近での変化が顕著に現れることがわかる。しかし、連続的な画像計測はデータ量が膨大となり簡便な植物体診断という目的には適さない。そのため、例えば光刺激を正弦波状にし、応答の振幅のみを計測するといった改良が必要であろう。

一方、電気刺激応答は非接触計測ではないという点が最大の問題となる。また、カボチャの様な明確な興奮性を示す植物が多数では無い。しかし、電気的な刺激は刺激を与える部域を限定でき、定量性や簡便さという点では優れている。

以上の様に、刺激応答の測定は単一で用いた場合、汎用の活性度計測という目的からは問題がある。しかし、生物は様々な生理活動がグループとなり関連しあっているため、測定部域を限定されたとしても植物体全体の情報を入手可能であると思われる。今後はそのような観点から、いくつかの刺激および応答を組み合わせることが必要であろう。そのようにして、多くの情報を入手することによって、植物の診断が可能になるものと思われる。

## References

- 1) 大政, 近藤, 井上編: 植物の計測と診断 朝倉書店 (1988)
- 2) ファイトテクノロジー研究会編: ファイトテクノロジー 朝倉書店 (1994)
- 3) 木下, 御橋編: 蛍光測定 学会出版センター (1983)
- 4) K. Omasa, K. Shimazaki, I. Aiga, W. Larcher and M. Onoe: *Plant Physiol.*, 84, 748(1987)
- 5) K. Imagawa, K. Toko, S. Ezaki, K. Hayashi and K. Yamafuji: *Plant Physiol.*, 97, 193 (1991)
- 6) 熊沢編: 植物生理学 5 水とイオン 朝倉書店 (1981)
- 7) U. P. Hansen, H. Dau, B. Bruning, T. Fritsch and C. Modaenke: *Photosynthesis Res.*, 28, 119 (1991)
- 8) W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling and B. P. Flannery (丹慶他訳): *Numerical Recipes in C*, 技術評論社 (1993)
- 9) 勝見, 増田編: 実験生物学講座16 丸善 (1983)
- 10) F. W. Bentrup: *Encyclopedia of Plant Physiol.*, 7, 42 (1979), and other papers in this volume.