

## 環境ストレスと植物の生態成長 — 光学的手法による乾燥傷害の早期検出 —

大矢 智幸\*・吉田 敏\*\*・川畑 龍三\*\*\*  
岡部 弘高\*\*\*\*・甲斐 昌一\*\*\*\*

### Early Detection Method of Drought Injury for Red Beans by Biophoton Measurement

Tomoyuki OHYA, Satoshi YOSHIDA, Ryuzou KAWABATA,  
Hirotaka OKABE and Shoichi KAI

(Received October 28, 1999)

**Abstract:** We have studied biophoton emission from red beans (*Vigna angularis*) under drought stress and found that biophoton response for drought stress depends on their growth stage. Strong photon radiation whose spatial distribution was different from one due to salt stress was observed at root apex within 10 minutes after they were exposed to dry condition. Strong radiation was also observed when they were rewatered. Moreover, photon intensity at rewatering changed owing to the damage by drought. Thus, it was obvious that photon radiation induced by drought stress is closely related with the physiological response of plants under stress. This showed that photon measurements are useful for the estimation of plant water condition and drought damage therefore is evaluated based on the photon information.

**Keywords:** Biophoton emission, Biophoton detection, Drought stress, *Vigna angularis*

#### 1. はじめに

干害は水害、塩害、冷害とならび農作物へ大きな被害をもたらす自然災害の一つである。その被害地域はアフリカや西アジアといった半乾燥地帯のみならず、数年前、米国のコーンベルトで生じた地下水位の低下による大干害のように、水不足の可能性を有している全地域が含まれる。しかしながら、植物内部の水環境状態を簡便に把握する手段が確立されれば、それらを未然に防ぐことが十分可能となる。これは水を自由に使うことができる地域に限ったことではなく、砂漠や半乾燥地帯など水の使用が制限されている地域においても、水を最大効率で利用することが可能となれば、

それらの被害を最小限に抑えられるであろう。しかし現在のところ、それに関し有効な手段は存在していない。

ところで、我々はこれまで、生物フォトンという生体シグナル<sup>①-③</sup>のひとつに注目し、その計測を通して、環境ストレスによりアズキの種子に引き起こされる生理的变化の早期検出や、その情報をもとにした植物内部の抗ストレス機構の理解を試みてきた。前報では環境ストレスの一つとして塩 (NaCl) に着目し研究を行った<sup>④</sup>。その結果、塩ストレスが印加されると生物フォトン放射に占める活性酸素由来の発光などの酸素を必要とする発光の割合が増すことや、根の部位によってフォトン応答が異なることなどが明らかになり、塩傷害の評価には生体内のホルモン濃度ともに生体内の活性酸素レベルの変動や、生長に伴うストレス感受性の変化といった要素も重要であることが示された<sup>⑤</sup>。

塩ストレス障害の一部は浸透濃度差による植物体内

平成11年10月28日 受理

\* 応用物理学専攻博士後期課程

\*\* 生物環境調節研究センター

\*\*\* エネルギー量子工学専攻修士課程

\*\*\*\* エネルギー量子工学専攻

の脱水に起因すると考えられており、実際、塩ストレス下と乾燥に暴露された植物体内では類似した変化が引き起こされている。すなわち木化の進行、新葉の矮小化、落葉などの形態変化や、ABA濃度の上昇、各種糖類・タンパクの発現、気孔の閉鎖、光合成効率、二酸化炭素吸収効率の減少などの生理変化である<sup>2)-5)</sup>。そこで、乾燥ストレスに対してもフォトン計測を通じて、耐乾ストレス機構の理解や、その傷害評価に関し新たな知見が得られるのではないかと推測し、その第一段階として、今回、フォトン計測を活用し、乾燥によって作物に引き起こされる種々の生理的な変化の検出を試みた。

具体的には次のようなことを行った。はじめに、乾燥に対する基本的な応答を調べるため、発芽後さまざまな日数を経たアズキ種子を乾燥にさらし、その際放出される生物フォトン計測した。また、乾燥が根の伸長に与える影響や、乾燥により誘導される発光の空間的な強弱、その減衰過程、ならびに乾燥の持続時間と再給水時におけるフォトン応答強度との関係を調べた。さらに、顕微鏡観察により乾燥持続時間と根細胞への傷害との関係を調べ、発光の発生の原因を明らかにしようと試みた。

## 2. 実 験

### 2.1 サンプル

本研究ではサンプルとして大納言秋アズキ (学名 *Vigna angularis* 中原採取場産) を採用し、特異的な個体を選別するため約 3000 個の中から標準偏差内の重量を持つものを研究に用いた。

種子は初めに発芽を促すため、恒温恒湿槽 (ヤマト科学社製: IG 47 M) 内で温度 35°C、湿度 95% に保ち 24 時間吸水させた。以後、この吸水終了時を 0 h とする。次に、別の恒温恒湿槽 (島津理化学器社製: BEC-II-350) 内に移し、温度 24°C、湿度 82% で生育させた。生育は光合成の効果を避けるため暗黒下で行い、12 時間毎の計測時のみ短い時間 (約 15 分)、暗緑色光を点灯した。

根長計測には、ガラスシャーレ (直径 120 mm) にイオン交換と蒸留により精製 (ADVANTEC 社製: GSH-200) された伝導度 0.10  $\mu\text{S}$  の純水 60 cc を張り、そこに種子 20 個を入れて生育したものを用いた。なお、生育溶液は水質の劣化を防ぐため 12 時間の測定毎に新しいものに取り替えた。また、フォトン計測用の種子は、脱脂綿を敷いたバット (縦 350 mm: 横 250

mm) に純水 400 cc を注ぎ、そこに種子を 7×7 の等間隔にならべて生育した。なお、バット、脱脂綿、生育溶液のいずれも 12 時間毎に新しいものと取り替えた。

### 2.2 フォトン計測

フォトン強度計測はサンプル 20 個を無蓋ガラスシャーレに入れて行った。計測用のシャーレにはルミネッセンスを防ぐため、暗室中に長時間安置していたものを使用した。なお、計測システムやその方法に関してはすでに詳細を報告している<sup>10)11)</sup>、ここでは計測に使用した装置のみを記す。経時変化の計測には冷却型光電子増倍管 (浜松ホトニクス社製: C-2550, 光電管 R 649) を、そして 2 次元計測には冷却型 2 次元光子計数管 (浜松ホトニクス社製: PIAS-TI 500, C-1809) をそれぞれ使用した。

### 2.3 顕微鏡観察

顕微鏡観察用のサンプルは次の手順で調製・検鏡した。はじめに、根端部位を 2~3 cm 切り取り、軽く水洗してから水気を拭き取った。次に、寒天液 (4.5%) を作り、40°C 以下に冷ましてから種子を包埋した。マイクロスライサ (堂阪イーエム社製: DTK-1500) で厚さ 150~250  $\mu\text{m}$  の横断切片を作成し、スライドガラス上にマウントして光学顕微鏡 (ニコン社製: Optiphot-2) を用いて検鏡した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 フォトン応答と乾燥傷害

我々はこれまでの研究から、発芽・発根期のアズキ種子は、それが幼初期であるほど植物ホルモンや塩に対する感受性が高いという知見を得ている<sup>11)</sup>。したがって、乾燥ストレスに対するフォトン応答も、乾燥が加えられた時期に種子が到達していた生長のステージによって変化することが予測される。そこで、植物の生長に伴う耐乾性の変化を調べるため、それぞれ、生長加速度最大、速度最大、生長鈍化のステージに該当する給水終了後 48 時間、96 時間、168 時間経過した根を乾いたシャーレに移し、平均温度:  $T=24^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度:  $\text{RH}=78\pm 5\%$  で約 60 時間乾燥状態下に置き、その際放出される生物フォトン計測した (図-1)。グラフ縦軸は、余剰フォトン強度  $I$  を表し、ストレス印加前の値  $X_0$  で印加後の値  $X$  を規格化している (式-1)。

$$I=(X/X_0-1)\times 100 \quad (1)$$

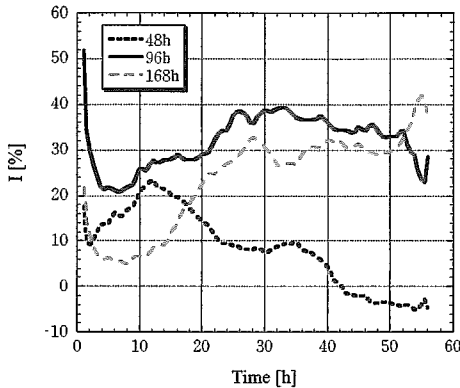


図-1 各生長ステージにおける乾燥に対する光子応答の変化。  
 グラフはそれぞれ、点線：給水終了後48時間の種子、実線：96時間、破線：168時間に担当。

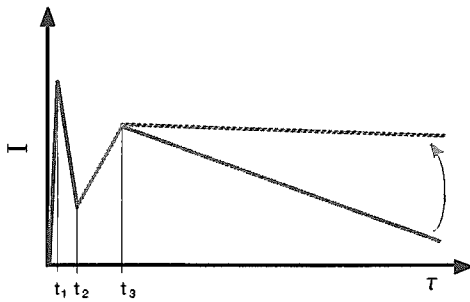
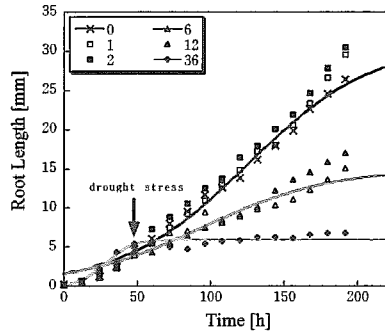


図-2 乾燥応答の概略図

ここで、 $X_0$ は溶液中の種子から放射される光子の約6時間の平均カウント数 [counts/h]、 $X$ は乾燥シャーレ中の種子から放射される光子の1時間あたりの平均カウント数 [counts/h]である。

図-1から、同じストレス強度であっても、それが印加された時期が種子のどの生長ステージに相当するかによって光子の強度やその時間的変動は大きく変わることが分かる。しかしながら、全体的に見ると各生長ステージの種子には共通して、ストレス印加約1時間目の強い発光と、その減衰後数時間目の発光量の再上昇が確認された。そこで、これら一連の光子応答に対して、乾燥ストレスを印加した時点と原点として、発光量の時間変動に特徴的な3つの時刻  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  を定め (図-2)、次にその時期と種子に引き起こされる乾燥傷害との対応関係を調べた。

まず、3時刻の決定が容易な給水後48時間の種子をサンプルとして選んだ。そしてそれらを乾燥状態 ( $T =$



example to 6h

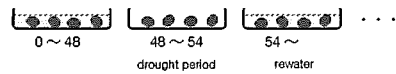


図-3 ストレスの印加時間と生長への影響。記号はそれぞれ乾燥時間、×：0時間、□：1時間、■：2時間 ( $t_2$ )、△：6時間、▲：12時間 ( $t_2 \sim t_3$ )、◆：36時間 ( $t_3 \sim$ ) に相当。

$24^\circ\text{C}$ ,  $\text{RH}=82\%$ ) に置いたのち、 $t_2$ 以前 (1時間と2時間)、 $t_2$ から  $t_3$ の間 (6時間と12時間)、および  $t_3$ 以後 (36時間) に再び種子を溶液中に戻し、その後の根の長さを計測し、ストレスの印加時間が根の生長に与える影響を調べた。またそれと並行して根細胞の顕微鏡観察を行い、乾燥による根組織の形態的变化を調べた。

図-3に、各期間のストレスを印加された種子根の生長曲線を示す。

$t_2$ までに再給水を行った種子では、ストレスを印加しなかったもの (対照) と比べその後の伸長に差はなかった。また顕微鏡観察 (図-4-a, b) から、対照との間に形態的な違いは認められないことから、 $t_2$ までは根は乾燥による傷害を全く受けないか、傷害が比較的軽微で、再給水による回復が可能であったことが示された。

一方、 $t_2 \sim t_3$ 中に再給水を行った種子では、再給水後の根が褐色がかった半透明を呈し、肉眼で正常な種子根と明確な違いの認められたサンプルが40個中10個と多数発生した。また、顕微鏡観察からも表皮細胞および皮層の表層の細胞において細胞壁が著しく変形し、細胞質も損傷を受けていると見られる細胞群が確認された (図-4-c)。したがって、時刻  $t_2$ 後の次の上昇過程ではすでに乾燥傷害が進行していることが明らかになった。なお、主根の先端部では枯死が確認されたが、サンプルを再び溶液中に戻すと、根の基部付近

から側根が発生し、それらは生長を続けたことから、基部は枯死を免れていることが示された。さらに、種子の中には、再給水後に主根が伸長を続けるものがあった。このことから、重量が標準偏差内で、かつ同じ生育期間に相当する種子間にも、耐乾性には顕著な個体差があることが示唆された。

時刻  $t_0$  からかなり時間が経過してから再給水を行った種子では、肉眼による観察から 20 個中 12 個と半数以上の種子の傷害が確認された。また再給水後、肉眼で傷害が認められた種子、認められなかった種子のいずれに対しても根の伸長や側根の形成は観測されなかった。したがって、大部分の種子が重大な乾燥傷害を受け機能停止に陥ったか、もしくは枯死したと考えられる。また再給水後の生育溶液が白濁したことから、膜が半透性を失い細胞内溶物が溶液中に浸出したことが分かった。さらに、顕微鏡観察からは細胞膜の崩壊のほか、脱水が極度に進行したことによる細胞壁の変形が確認された(図-4-d)。したがって、この時期においては乾燥傷害が著しく進行し、組織の壊死を起していることが示された。

### 3.2 根端部の生物フォトン放射

次に、根端付近に誘導されるフォトン放射強度の空間的・時間的な変動を調べるため、種子を乾燥シャーレ上で  $T=24^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RH}=50\pm 3\%$  の状態に置き、根端から放射されるフォトンの 2 次元計測を行った。なお、計測には、根が比較的長く発光量も多い、給水終了後 110~140 時間内の種子を使用した。

図-5-a に乾燥にさらされた種子根端部からの発光の様子を示す。発光強度はストレス印加後 20~30 分で最大値をとり、その後 5~6 時間かけて減衰した(図-5-b)。フォトン は種子根全体から放出されたが、特に先端部で比較的強い発光が認められた。このことから、乾燥に対する種子根のフォトン応答は部位によって偏りのあることが明らかになり、それと同時に乾燥に対する応答の感受性が根の部位により異なっている可能性が示された。また、根端部に誘導されたフォトン放射の空間分布に関しては、塩ストレスを印加した場合、先端部の発光強度が著しく強く局所的なものに対し<sup>19)</sup>、乾燥ストレスでは全体的に発光する傾向が強く、両者は異なっていた。このことから、印加されたストレスの種類によって植物の応答機構が異なり、その違いはフォトン応答の違いとして現れた可能性が示唆された。

さらに、根端部の発光に対しては、形態的な面から

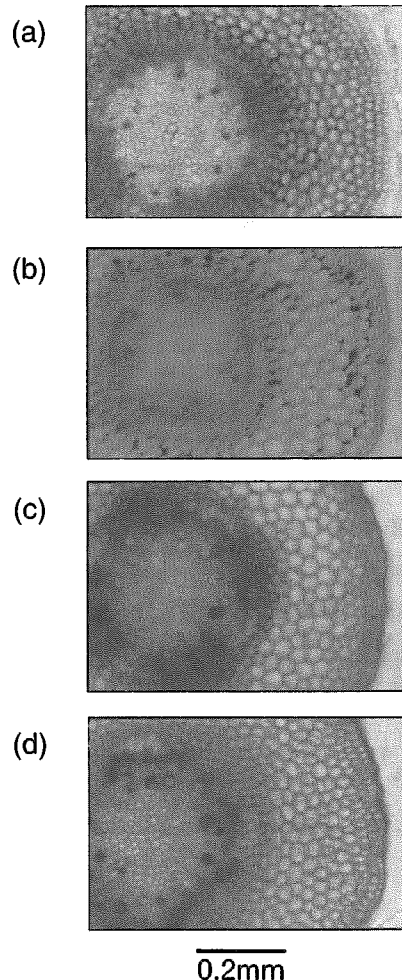


図-4 根端付近の細胞に引き起こされた乾燥による形態変化。それぞれ ref: (a), 1 時間乾燥: (b), 12 時間乾燥: (c), 36 時間乾燥: (d)。

以下のように考察される。根は地下組織であり、茎や葉などの様に極度の乾燥条件にさらされる地上組織と比べ、構造的に乾燥に対して弱い<sup>18)</sup>。したがって、ストレス印加後の根全体から観測された発光は、根の外側から脱水・酸化などによる細胞膜や細胞質成分の変性・破壊が進行して行く過程で発生したと推測される<sup>16)</sup>。しかしながら、先端部の強い発光に関しては、そこが根の中でも特に膜形成の不完全な未熟な細胞が多い部位であることを考慮しても、粘性多糖(mucilage)で覆われており、20~30 分で根端の細胞間隙中の水が全て蒸発し、直接それらの部位が空気にさらされ発光したとは考え難い。また実際、同じ乾燥状態に 1 時間

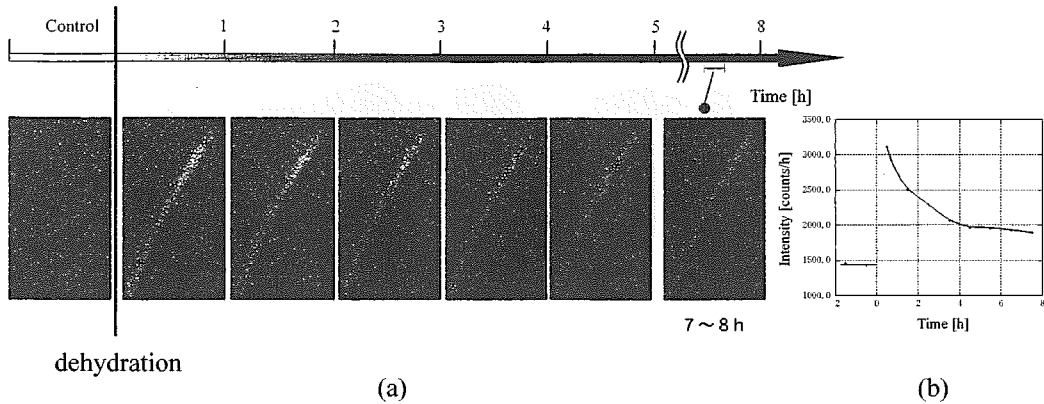


図-5 乾燥によって誘導された根端付近の発光(積算時間=1時間、図中1は1mmに相当する)の様子(a)と、その経時変化(b)。

さらした種子根をいくつか顕微鏡観察してみても、一番傷害のひどいものでも表皮細胞が一層破壊されていた程度で、柔細胞や中心部は全く影響を受けていなかった。

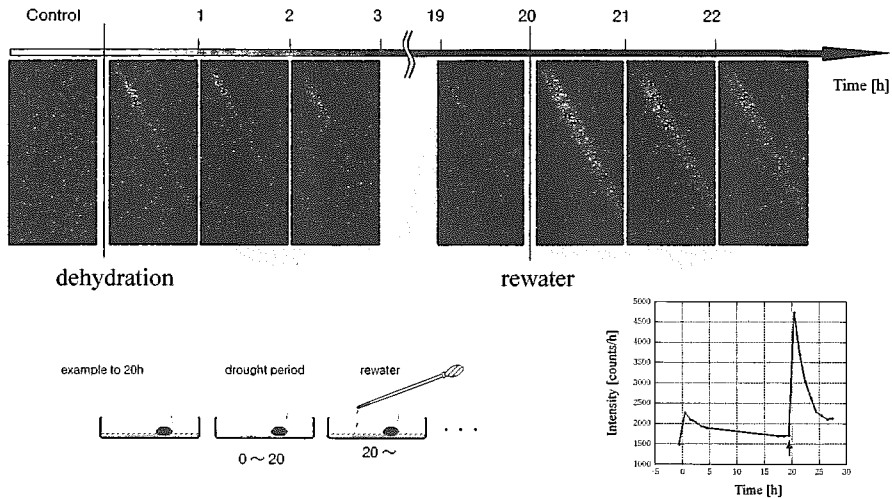
前述したように、一般に乾燥にさらされた植物の応答には、気孔閉鎖や葉面積の縮小といったマクロなもの以外に、抗ストレス、あるいは適応反応の一環として植物ホルモンABAやLEA protein (dehydrin), proline, マンニトールなど各種適合溶質の発現の誘導がある<sup>24-25)</sup>。したがって、これらホルモンやタンパクなどの合成過程による一時的な生理活性の上昇の可能性が考えられる。しかしながら、乾燥傷害には活性酸素の関与も報告されているため<sup>15)</sup>、乾燥に伴って生じた活性酸素により引き起こされた可能性も無視できない。いずれにしてもこの問題に関しては、波長の同定などさらなる調査が必要である。

### 3.3 ストレスの印加と緩和過程に伴うフォトン放射

乾燥にさらされた植物の根に強い発光が誘導されることは先に述べた。この他、乾燥にさらされた根では、再給水時に強い発光を示す現象がポトスで報告されている<sup>17)</sup>。そこで、ここではアズキ種子根を様々な時間乾

燥にさらし、ストレスの印加時間と再給水時に生じるフォトン放射強度との関係を定量的に調べた。また、種子を同じ乾燥条件下( $T=24^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RH}=50\%$ )に置き、定期的にその重量を計測し種子内水分量の変化を調べた。

図-6から明らかかなように最初の乾燥ストレスの印加によりピーク $P_1$ が現れ、再給水時直後にもピーク $P_2$ が現れた。ここで、ピークの前後値の差 $I_P$ をその高さとおくと、ピーク高は常に再給水時の方が大きい( $I_{P2} > I_{P1}$ )ことが分かった。また、再給水時のピーク高 $I_{P2}$ はストレス印加時間に対して変化することが明らかになった(図-7-a)。特に強い発光が観測された乾燥後20時間付近では、種子内水分の70%近くが消失しており(図-7-b)、乾燥傷害は原形質分離による膜の破損、一部細胞壁の変形など時刻 $t_0$ のレベルに近づいている。したがって、これら傷害の著しい種子が再給水時に発光した原因のひとつとしては、再給水により、生体膜の破損箇所から流出したオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、リパーゼなどの分解酵素によって細胞質が分解されたため、その発エルゴン反応過程で発光現象が生じたことが推測される<sup>12)-14)</sup>。



図—6 乾燥によって誘導された根端付近の発光と再給水時(↑の地点)の発光の様子とその経時変化。積算時間=1時間、図中1は1mmに相当する。

#### 4. ま と め

乾燥にさらしたアズキ種子からは光子が放出されること、その強度や時間変化はストレスが印加された生長段階によって変化することが明らかになった。また、乾燥ストレスは数分で根端部に強い発光を誘導し、その放射パターンは塩ストレス印加時に観測されるものとは異なっていることが明らかになった。さらに、再給水時にも根端に強い発光が誘導され、その強度変化は種子が受けた乾燥傷害のレベルと関係していることが示唆された。以上から、乾燥ストレスに対する種子の生理的応答と光子放射強度の変動が密接に関係しており、乾燥傷害の早期検出やその傷害の定量化、ストレスの種類識別等への生物光子の応用の可能性が示された。

今回注目した光子計測による植物内部の水環境モニタリング技術は、干害対策のみならず、果菜・果樹生産における果実の生長と成熟に対応した段階的な水管理技術や植物工場における最適生育条件の設定などにも大きな役割を果たすと期待される。今後、乾燥と生体内活性酸素の関係など、更なる調査が必要である。

#### 5. 謝 辞

本研究は文部省科学研究費補助金萌芽的研究(2)課題番号 09878108 の一部として行ったものである。

#### 参 考 文 献

- 1) S. Kawaguchi, M. Mimura, T. Ohya, H. Okabe and S. Kai: 九州大学工学集報, **72** (1998) 283-290.
- 2) H. J. Bohnert, D. E. Nelson and R. G. Jensen: *Plant Cell.*, **7** (1995) 1099-1111.
- 3) F. Cellier, G. Conéjéro, J.-C. Bretiler and F. Casse: *Plant. Physiol.*, **116** (1998) 319-328.
- 4) X. Socias, M. J. Correia, M. Chaves and H. Medrano: *J. Exp. Bot.*, **48** (1997) 1289-97.
- 5) J. Ingram and D. Bartels: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47** (1996) 377-403.
- 6) 小林正樹, 宇佐史, 稲場文男: 計測自動制御学会論文集, **30** (1994) 385-391.
- 7) M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba: *Frontiers Med. Biol. Eng.*, **7** (1996) 299-309.
- 8) M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba: *Photochem. Photobiol.*, **65** (1997) 535-537.
- 9) 鈴木喜隆: 稲場生物光子プロジェクト研究概要集 (1991) 279-98.
- 10) S. Kai, T. Mitani, M. Fujikawa: *Physica A*, **210** (1994) 391-402.
- 11) S. Kai, T. Ohya, K. Moriya, T. Fujimoto: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **34** (1995) 6530-38.
- 12) 山田理恵: 稲場生物光子プロジェクト研究概要集 (1991) 127-133.
- 13) 吉川敏一: フリーラジカルの科学 講談社 (1997).
- 14) G. P. Bolwell and P. Wojtaszk: *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, **51** (1997) 347-366.

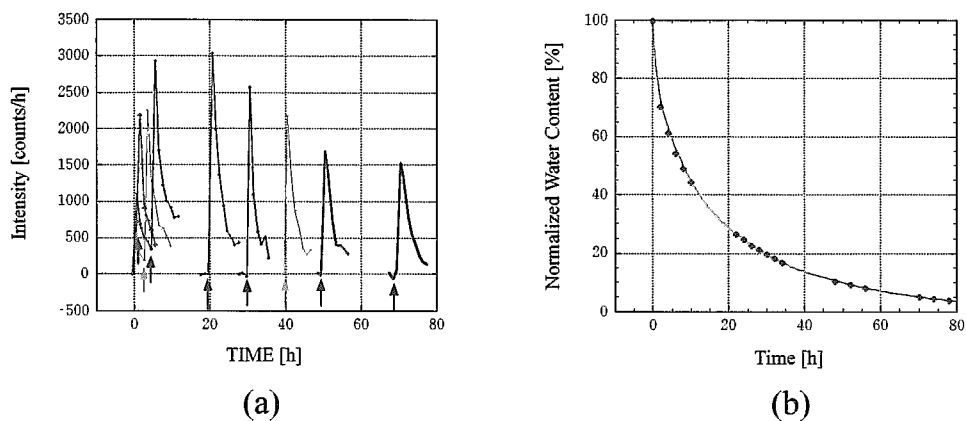


図-7 (a) ストレスの印加時間と再給水時におけるフォトン放射強度の関係。フォトン強度は再給水直前の値をバックグラウンドとして差し引いた値を表している。  
 (b) ストレス印加時間と種子重量の変化。乾燥から200時間後の完全に乾燥した状態(枯死状態)の種子重量を0、乾燥にさらす直前の重量を100として換算している。

- 15) A. H. Price, N. M. Atherton and G. A. F. Hendry :  
*Free. Rad. Res. Commun.*, 8 (1989) 61-66.  
 16) K. Skriver and J. Mundy : *Plant Cell*, 2 (1990) 503-  
 12.  
 17) 宇佐史: 稲場生物フォトンプロジェクト研究概要集

- (1991) 239-277.  
 18) 原襄, 植物形態学 朝倉書店 (1994).  
 19) T. Ohya, H. Kurashige and S. Kai : 九州大学工学集  
 報, 71 (1998) 575-581.