

## 携帯式デジタル顕微鏡を用いた野外での熱帯樹種の

## 気孔開閉観察と蒸散特性

田中憲蔵・米田令仁(森林総研)・Mohamad Alias Azani・Nik Muhamad Majid (マレーシアプトラ大)

**Abstract:** Direct observation of stomatal movement was studied in six tropical trees (*Morinda citrifolia*, *Garcinia mangostana*, *Cinnamomum iners*, *Syzygium* sp., *Fagraea fragrans*, *Cynometra cauliflora*) by using handy digital microscope (Scalar, DG-3) in Selangor, Malaysia. Diurnal leaf transpiration rate and stomatal conductance were measured at 9:00, 12:00, 14:00, and 16:00 by portable photosynthesis meter (LI-6400) in May 2007. After the gas exchange measurements, stomatal openness was observed by handy digital microscope (magnitude 500, Scalar, DG-3). Stomatal density and size differed significantly among studied species. Observation of stomatal openness of several species was difficult by their dense leaf hair and wax at leaf lower surface. Stomatal conductance and stomatal aperture width in the morning condition showed higher value than in the afternoon condition. Stomatal conductance also significantly related with stomatal density and stomatal aperture width. From our results, DG-3 can be used to nondestructive stomatal observation for several tree species under *in situ* condition.

**Key words:** Stomatal observation, DG-3, stomatal conductance, tropical rainforest, Malaysia

**要旨:** Scalar社製の携帯式デジタル顕微鏡(DG-3)と携帯式光合成蒸散測定装置(LI-6400)を用い、野外で熱帯樹木6種(*Morinda citrifolia*, *Garcinia mangostana*, *Cinnamomum iners*, *Syzygium* sp., *Fagraea fragrans*, *Cynometra cauliflora*)の気孔開閉状態と蒸散、光合成速度、気孔コンダクタンス( $g_s$ )の日変化を調べた。調査はマレーシアセランゴール州UPM大学構内に植栽された樹木で2007年5月に行った。調査日の天候は快晴で、日中の有効光合成放射(PAR)は $1700(\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s})$ に達した。測定は9時、12時、14時、16時に行い、葉のガス交換測定後すぐに測定位置の顕微鏡写真を倍率500倍で撮影した。調査樹種間で気孔のサイズや密度は大きく異なり、孔辺細胞が $20\mu\text{m}$ 以下の*Syzygium*や葉毛やワックスの多い*C. iners*では観察が難しかった。蒸散量や $g_s$ と気孔密度や気孔口幅には相関が見られ、午前中は口幅、 $g_s$ 共に高く、午後は両者とも低下した。今回の結果から、携帯式デジタル顕微鏡を用いることで野外での非破壊的な気孔開閉運動の観察が可能であることが分かった。

**キーワード:** 気孔開閉観察, DG-3, 気孔コンダクタンス, 熱帯雨林, マレーシア

## I はじめに

気孔は葉の二酸化炭素や水蒸気などのガス交換の制御にとって不可欠な働きを持つ(14)。気孔の形態や開閉パターンなどの特性は、種によって様々に異なり、環境適応にも密接な関係がある(2, 15)。特に気孔の開閉パターンは葉内でも一様でないことが明らかになりつつあり、さまざまな観察手法の開発が続けられてきた(5, 16)。気孔の代表的な観察法として、瞬間接着剤などを用いたレプリカ法、浸潤液を用いた浸潤法などがある(6, 3, 11, 13)。これらの方法は、費用が安く、道具の持ち運びも容易なため野外で行うのに適している。しかし、この方法の多くは破壊法であるため、連続して同じ葉の気孔開閉を観察することは難しい。気孔開閉の非破壊的観察法としては、顕微鏡で直接連続的に観察する方法や、サーモグラフィなどを用いて間接的に蒸散量を推定する方法が開発されてきたが、大掛かりな設備が必要なため野外での調査には向かなかった(7, 8, 9, 18, 19)。しかし、近年、高性能なデジタル顕微鏡の小型軽量化が進み、医療、工業

現場で幅広く使われるようになってきている。この研究ではScalar社が開発した携帯式デジタル顕微鏡(DG-3)を用い、①野外での気孔開閉観察がどの程度可能なのか、②測定した蒸散速度や気孔コンダクタンスと観察した気孔の開度が一致するか、検討し報告する。

## II 材料と方法

調査は、マレーシアセランゴール州のマレーシアプトラ大学構内で行った。調査地の年降水量は2700mm、年平均気温27度で明確な乾季は存在しない。調査対象として、*Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae)、*Garcinia mangostana* L. (Clusiaceae)、*Cinnamomum iners* Reinw. (Lauraceae)、*Syzygium* sp. (Myrtaceae)、*Fagraea fragrans* Roxb. (Loganiaceae)、*Cynometra cauliflora* L. (Fabaceae)の東南アジア原産6樹種を選んだ。調査個体は2004年に植栽し、光環境はほぼ全天であった。*Syzygium* spと*G. mangostana*はそれぞれ1個体から計3枚の葉を、その他の樹種は3個体から計3枚の葉を選び測定に用いた。測定葉には枝

先より3から5番目の老化していない成葉を選んだ。

葉の蒸散速度、光合成速度、気孔コンダクタンスの日変化を、携帯式光合成蒸散測定装置(LI-6400)を用い野外で測定した。測定は2007年5月の快晴日に行い、日中の有効光合成放射(PAR)は1700( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )に達した。測定は9時、12時、14時、16時に行ない、測定後すぐに同じ箇所、気孔サイズや密度、開口部の大きさなどを携帯式デジタル顕微鏡(Scalar, DG-3)で撮影した。観察には倍率500倍のレンズを用いた。DG-3の重量は約490g、またバッテリー駆動が可能のため野外での使用に適している。デジタル写真の総画素数は約230万画素で、使用可能温度は0から40度である。

### III 結果と考察

#### 1. 気孔の形態と気孔開閉の観察 気孔サイズや気孔密

度は樹種により大きく異なり、葉の裏面の状態により観察が難しい樹種が見られた。孔辺細胞の長さは *G. mangostana* の35 $\mu\text{m}$  から *Syzygium* sp. の17 $\mu\text{m}$  まで2倍程度異なった(表-1, 図-1)。また気孔密度も樹種間で大きな違いがあり、*M. citrifolia* や *Syzygium* sp. では600個/ $\text{mm}^2$  近い値を示したが、*G. mangostana* や *C. cauliflora* では、100個/ $\text{mm}^2$  前後と少なかった(表-1, 図-1)。*C. iners* は葉の裏面に葉毛やワックス状の物質が多く、*Syzygium* sp. では気孔サイズが小さいため気孔の開閉観察が難しかった(図-1)。また、孔辺細胞の長さが約20 $\mu\text{m}$  以上あれば比較的観察が容易であると考えられた。さまざまな地域の気孔サイズの観察結果から、熱帯樹種では43-84%、日本の樹種やイネ科草本でも半数以上の種が20 $\mu\text{m}$  以上の孔辺細胞を持ち(1, 4, 10)、サイズ的には多くの種でDG-3による観察が可能であると思われた。一方、葉毛の密生

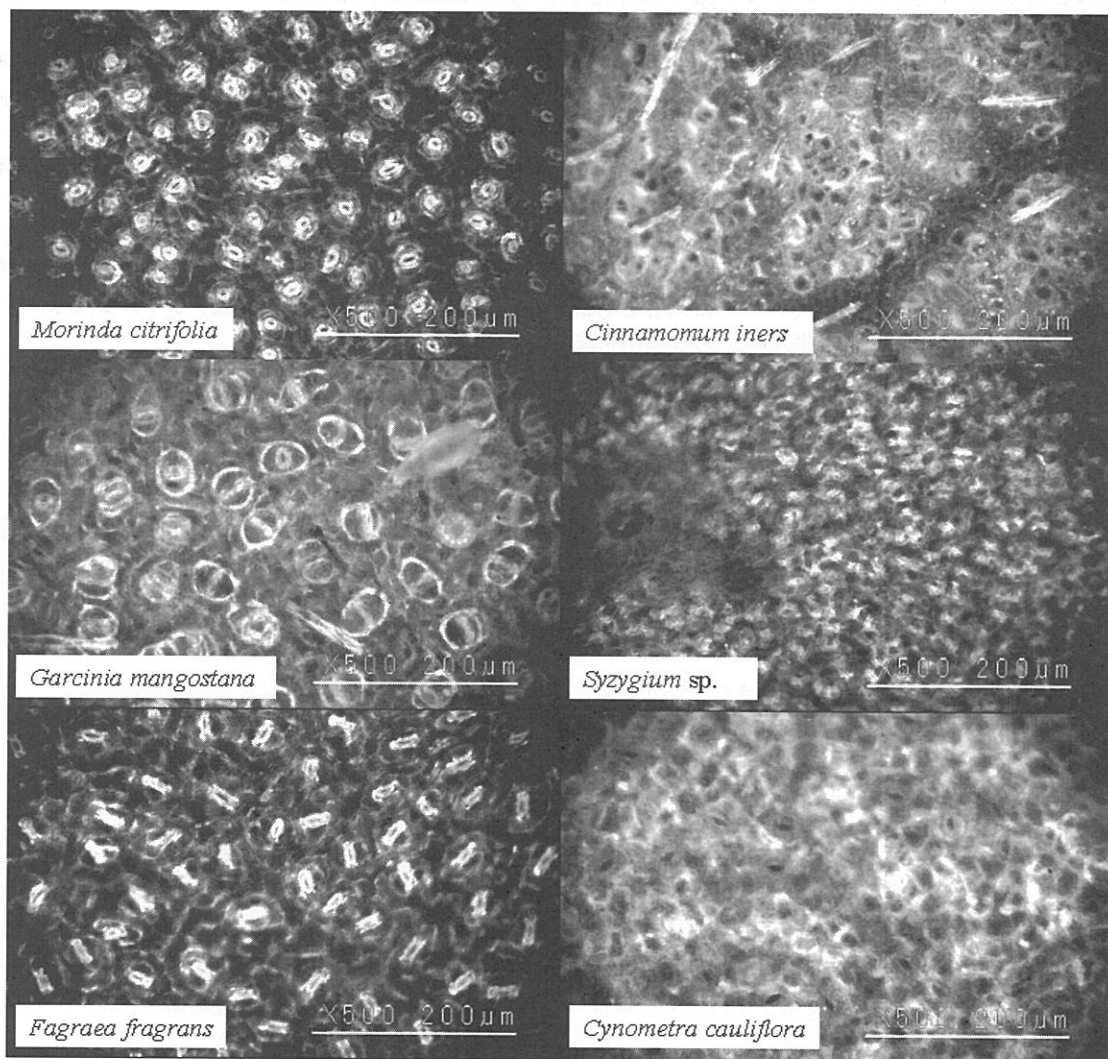


図-1. 葉の裏面の顕微鏡写真

Fig-1. Microphotographs of leaf lower surface

している樹種では気孔観察が難しく、観察するにはガムテープなどを用いて裏面の毛を剥ぐなどの処理が必要であると考えられた (12)。

表-1. 気孔密度と孔辺細胞長

Table-1. Stomatal density and guard cell length

Species	Stomatal density (mm <sup>-2</sup> )	Guard cell length (μm)
<i>Morinda citrifolia</i>	350	31.4
<i>Garcinia mangostana</i>	134	35.5
<i>Cinnamomum iners</i>	460	18.5
<i>Syzygium</i> sp.	571	17.0
<i>Fagraea fragrans</i>	320	27.5
<i>Cynometra cauriflora</i>	99	20.7

2. 気孔開閉と気孔コンダクタンス(*gs*)の日変化 気孔口幅 (SAW; stomatal aperture width)と気孔コンダクタンス (*gs*)はほぼ連動して日変化し、種内の *gs* の変化は気孔の口幅で調節されていると考えられた (20, 17)。観察が難しく除外した *C. iners* 以外の5樹種では、9時から12時にかけて気孔口幅、*gs* が共に大きく、14時から16時にかけて共に低下した(図-2)。しかし、種間で比較すると、ほぼ同じ気孔口幅を示した、*M. citrifolia* と *G. mangostana* 間などでは *gs* は5倍以上に大きく異なった。この差は気孔密度の違いが原因であると考えられた。

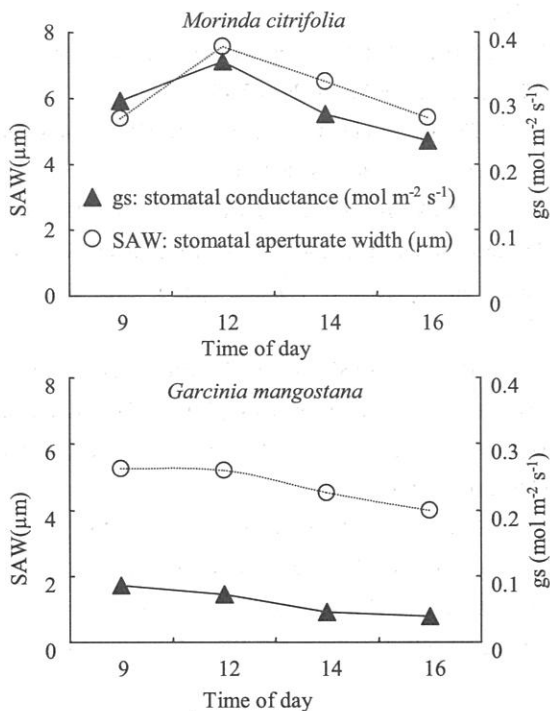


図-2. 気孔コンダクタンスと気孔口幅(SAW)の日変化 代表として *M. citrifolia* と *G. mangostana* の値を示す。

Fig-2. Diurnal changes of stomatal conductance (*gs*) and stomatal aperture width (SAW)

3. 蒸散速度と気孔密度、気孔開度の関係 気孔密度や

気孔開度指数 (気孔密度×気孔口幅) と蒸散速度や *gs* の間には有意な正の相関が見られ、葉の蒸散速度や *gs* には気孔密度と気孔口幅が密接に関係していると考えられた。気孔密度と午前9時に測定した蒸散速度、*gs* の間には有意な正の相関が見られた (図-3A, 3C)。しかし、

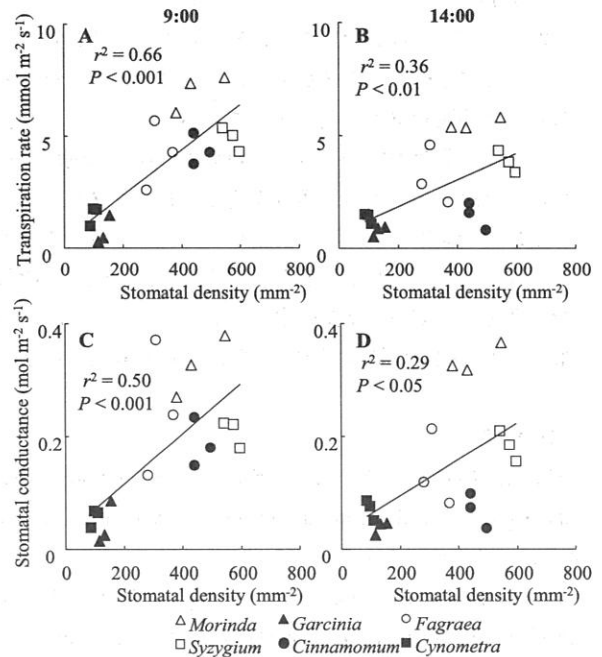


図-3. 気孔密度と蒸散速度、気孔コンダクタンスの関係 Fig-3. Stomatal density in relation to transpiration rate (A, B) and stomatal conductance (C, D)

図-4. 気孔開度指数と気孔コンダクタンス

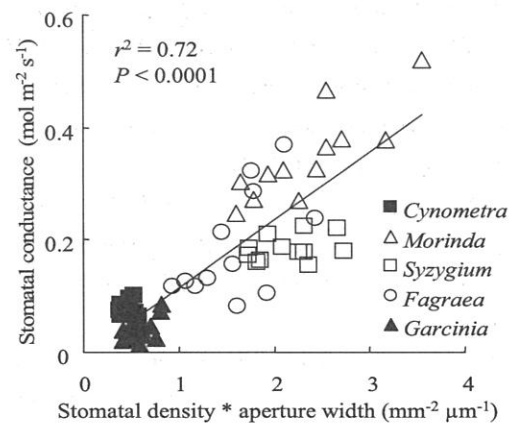


Fig-4. Relation between stomatal aperture index (stomatal density \* SAW) and stomatal conductance

気孔密度と午後に測定した蒸散速度や気孔コンダクタンスとの間の相関係数は低下し、ばらつきが大きくなった (図 3B, 3D)。このばらつきは気孔口幅が午後に低下したためと考えられた。そこで気孔口幅の変化を考慮するため、気孔口幅と気孔密度をかけた気孔開度指数と *gs*

の関係を調べたところ、相関係数が 0.72 と高い相関を示した (図 4)。このことから  $g_s$  の種間差には気孔密度だけでなく気孔口幅が密接に関係していると考えられ、イネなどから得られた同様の結果と矛盾しなかった (3, 17)。

#### IV おわりに

携帯式デジタル顕微鏡を用いることで、孔辺細胞が大きく裏面に毛やワックスが少ない樹種については野外での気孔の開閉観察が可能であることが分かった。また、気孔密度と蒸散速度や、気孔開度指数と  $g_s$  に相関が見られたことから、測定した蒸散速度や気孔コンダクタンスと DG-3 で観察した気孔の開度がおおむね一致すると考えられた。今後、測定精度を上げるために、様々な樹種での調査や、電子顕微鏡観察やレプリカ法で得られた結果との整合性を比較検討する必要があると考えられた。

#### 引用文献

- (1) BONGERS, F. and POPMA, J. (1990) Leaf characteristics of the tropical rain forest flora of Los Tuxtlas, Mexico. *Bot. Gaz.* 151: 354-365.
- (2) FRANKS, P. J. and FARQUHAR, G. D. (2007) The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiol.* 143: 78-87.
- (3) GHOSH, A. K., ISHIJIKI, K., TOYOTA, M., KUSUTANI, A. and ASANUMA, K. (2000) Water potential, stomatal dimension and leaf gas exchange in soybean plants under long-term moisture deficit. *Jpn. Trop. Agr.* 44: 30-37.
- (4) GRUBB, P. J., GRUBB, E. A. A. and MIYATA, I. (1975) Leaf structure and function in evergreen trees and shrubs of Japanese warm temperate rain forest. I. The structure of the lamina. *Bot. Mag. Tokyo* 88: 197-211.
- (5) 広見徹・二宮生夫・小池孝良・荻野和彦 (1999) サラワク熱帯降雨林におけるフタバガキ科林冠構成樹の不均一な気孔開閉による蒸散速度の調節. *日本生態学会誌* 49: 68-76.
- (6) 広瀬竜郎・伊豆田猛・三宅博・戸塚績 (1992) 瞬間接着剤を用いた気孔の型取り観察法. *日作紀* 61: 159-160.
- (7) KAISER, H. and KAPPEN, L. (1997) *In situ* observations of stomatal movements in different light-dark regimes: the influence of endogenous rhythmicity and long-term adjustments. *J. Exp. Bot.* 48: 1583-1589.
- (8) KAISER, H. and KAPPEN, L. (2000) *E In situ* observations of stomatal movements and gas exchange of *Aegopodium podagraria* L. in the understory. *J. Exp. Bot.* 51: 1741-1749.
- (9) KAPPEN, L., ANDRESEN, G. and LÖSCH, R. (1987) *In situ* observation of stomatal movements. *J. Exp. Bot.* 38: 126-141.
- (10) 川満芳信・縣和一・比屋根真一・村山盛一・野瀬昭博・新城長有 (1996) 葉身のガス交換速度と気孔の関係. *日作紀* 65: 624-633.
- (11) KENZO, T., ICHIE, T., WATANABE, Y. and HIROMI, T. (2007) Ecological distribution of homobaric and heterobaric leaves in tree species of Malaysian lowland tropical rainforest. *Am. J. Bot.* 94: 764-775.
- (12) KENZO, T., YONEDA, R., AZANI, M. A. and MAJID, M. M. (2008) Changes in leaf water use after removal of leaf lower surface hairs on *Mallotus macrostachyus* (Euphorbiaceae) in a tropical secondary forest in Malaysia. *J. For. Res.* 13: 137-142.
- (13) KOIKE, T., WATANABE, T., TODA, H. and HAIBARA, K. (1998) Morphological diversity of stomata of representative broadleaved trees in a temperate region: detection with Sump method. *For. Res. Environ.* 36: 57-65. 801-808.
- (14) LAMBERS, H., CHAPIN III, F. S. and PONS, T. L. (1998) *Plant physiological ecology*. pp540. Springer-Verlag, New York.
- (15) LARCHER, W. (2003) *Physiological Plant Ecology*. 4th Edn. 513 pp. Springer-Verlag, New York.
- (16) MOTT, K. A. and BUCKLEY T. N. (1998) Stomatal heterogeneity. *J. Exp. Bot.* 49: 407-417.
- (17) MURAYAMA, S. and TAJIMA, K. (1990) Leaf conductance in Japonica and Indica rice varieties. I. Size, frequency, and aperture of stomata. *Jpn. J. Crop Sci.* 59: 801-808.
- (18) 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.
- (19) OMASA, K., HASHIMOTO, Y., KRAMER, P. J., STRAIN, B. R., AIGA, I. and KONDO, J. (1985) Direct observation of reversible and irreversible stomatal responses of attached sunflower leave to  $SO_2$ . *Plant Physiol.* 79: 153-158.
- (20) SHIRAISHI, M., HASHIMOTO, Y. and KURAISHI, S. (1978) Cyclic variations of stomatal aperture observed under the scanning electron microscope. *Plant Cell Physiol.* 19: 637-645.