

‘川野ナツダイダイ’実生葉の気孔開度の制御に及ぼす fusicoccin の影響

平塚 伸・塩崎 修志¹・松島 二良²・河瀬 憲次*
三重大生物資源学部, *大阪府立大学農学部

Effect of Fusicoccin on Regulation of Stomatal Aperture in Leaves of ‘Kawanonatsudaidai’ Seedlings (*Citrus natsudaidai* HAYATA)

Shin HIRATSUKA, Shuji SHIOZAKI¹, Jiro MATSUSHIMA² and Kenji KAWASE
Faculty of Bioresources, Mie University, *College of Agriculture, University of Osaka Prefecture

Abstract

The effects of fusicoccin (FC), a toxin produced by fungus *Fusicoccum amygdali* Del., on transpiration rate and stomatal opening were examined and potassium ion concentration in stomatal guard cells in the leaves of *Citrus natsudaidai* nucellar seedlings was determined.

FC (25 ppm) increased the transpiration rate of leaves 2 days after treatment, while 100 ppm abscisic acid (ABA) depressed it significantly. The effect of ABA was negated by FC applied 2 hours after ABA treatment. At 3 hours after FC treatment, stomata were considerably opened and aperture size gradually increased up to 12 hours. Histochemical observation indicated potassium concentration in guard cells of FC-treated leaves to significantly exceed that of untreated control leaves.

FC thus induces strong physiological response in citrus and may thus be useful as a chemical-control agent for citrus culture, as a transpiration accelerator or antagonist of ABA.

Key words: ABA, *Citrus natsudaidai*, fusicoccin, leaf transpiration rate, stomata

緒 言

フシコクシン (FC) は糸状菌の *Fusicoccum amygdali* Del. が生産する毒素で、細胞伸長促進などのオーキシンと類似の作用^{4,5,8)}、種子の休眠打破などのジベレリン

様の作用^{1,2)} および気孔の開閉調節⁷⁾ などの作用を示すことが数種の高等植物で知られている。このような多面的な生理作用を持つ FC には、既往の植物生長調整物質では調節できなかった園芸植物の様々な反応を制御できる可能性がある。しかし、園芸植物、特に果樹類についてこれらの可能性を調べた研究例はほとんどない。そこで本研究では、FC がカンキツに対して他の植物と同様の生理作用を示すかどうかを知る目的で、‘川野ナツダイダイ’実生葉の蒸散、気孔開度および孔辺細胞へのカリウムイオンの蓄積に及ぼす FC の影響を調べた。これ

平成5年10月1日 受理

現住所；1: 大阪府立大学農学部, 2: 名古屋女子大学
Present address; 1: College of Agriculture, University of
Osaka Prefecture,
2: Nagoya Women's College

らの気孔開閉調節機能は既往の生長調整物質では認められておらず、FC がカンキツ類のケミカルコントロール剤として利用できるか否かの一つの指標となるとともに、FC の新しい利用法を開発するための基礎データになると思われる。

材料および方法

植物材料

材料には、'川野ナツダイダイ' (*Citrus natsudaidai* HAYATA) の珠心胚から得た鉢植え2年生実生苗を用いた。珠心胚実生は交雑実生と異なって遺伝的形質が母系と全く同一のため、均一な個体群を得られるという利点がある。

試薬の調整

イタリア Milan 大学の E. Marré 博士より FC の惠贈を受けた。FC は少量のエタノールで溶解後、0.1%の展着剤 (Tween-20) を含む 25 ppm 水溶液 (pH 6.5) とした。また、気孔を閉鎖して強い蒸散抑制作用を示すことが知られているアブシジン酸 (ABA, Sigma, mixed isomers) は、最初少量の 0.1N NaOH 溶液で溶解後水で希釈し、HCl で pH 7.0 に調整して 0.1% Tween-20 を含む 100 ppm 溶液とした。

FC, ABA の処理および蒸散速度の測定

FC, ABA および対照 (0.1%の Tween-20 を含む蒸留水) 処理は午前9時に行い、処理1日前から処理後3日目まで1日1回同時刻に蒸散速度を測定した。次に、FC と ABA の拮抗作用を調べる目的で、ABA 処理後に FC 処理を行った。午前9時に ABA 処理を行った後、2時間目 (ABA+FC) および2時間目と4時間目 (ABA+FC+FC) に FC 処理を行い、ABA 処理後から2時間毎に午後11時まで蒸散速度を測定した。それぞれの処理には、新梢の先端から4-6枚目の健全な葉2枚を供試し、葉全体に筆で塗布処理した。なお、実験は無加温・自然日長のガラス室内で行い、鉢植え実生は土壌表面が乾燥しない程度に灌水した。

蒸散速度はポロメーター法によって測定した。すなわち、Autoporometer (Lambda Co. Ltd., Model LI-65) を用いて 2 cm^2 の葉の裏面から蒸散した水蒸気が 2.8125

cm^3 のチャンバー内の湿度を飽和するのに必要な時間 (秒) として測定した。したがって、時間が長いほど蒸散速度が遅いことを示す。なお、蒸散に影響する葉温も同時に測定したが、処理区と対照区の間でほとんど差がなかった。測定は1葉につき2反復とし、各処理区の平均値を示した。

気孔開度の測定

気孔の開度測定は、FC 処理直後および処理後3, 6, 9, 12および24時間目に行った。シリコンゴムで速やかに葉の裏面の型を取り、顕微鏡下で気孔の開度を測定した。一般に光が当たると気孔は開き、特に青色光は著しい影響を与えることが知られている。したがって、この実験では FC 処理の効果をより明確にするため、処理後の実生は 23°C の暗黒下に置いた。

孔辺細胞中のカリウムイオン濃度の測定

孔辺細胞中のカリウムイオンの染色は Mansfield と Jones の Cobaltinitrite法³⁾ を若干修正して行った。すなわち、処理後6時間目に葉の裏面の表皮を注意深くはぎ取り、水冷した sodium cobaltinitrite 反応液 $\{\text{Co}(\text{NO}_2)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}: 4\text{g}, \text{NaNO}_2: 7\text{g}, \text{CH}_3\text{COOH}: 2\text{ml}, \text{H}_2\text{O}: 13\text{ml}\}$ に30分間浸漬した後、水冷した蒸留水で洗浄した。この表皮を2分間10%の $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 溶液で処理し、蒸留水で洗浄後顕微鏡下で観察した。カリウムイオンの集積程度は、 K^+ の存在を示す孔辺細胞中の黒い沈殿の密度とその面積によって評価した。

結果および考察

葉の蒸散速度に及ぼす FC の影響を Fig. 1 に示す。処理前の葉は、ポロメーターのチャンバーが飽和湿度に達するのに20秒前後かかったが、ABA 処理区の処理前の値は約14秒でやや蒸散速度が高かった。これは、葉の發育ステージの若干の違いによると思われる。対照区は、処理後1日を経過した頃より蒸散量の減少傾向を示し始め、2日目に著しい減少を示した後増加した。処理後2日目の著しい減少は、おそらく展着剤を含んだ蒸留水を塗布したためと考えられるが、詳しい原因については明らかにできなかった。一方、FC 処理葉は、チャンバーの飽和達成時間として12~20秒の間を安定して維持し続

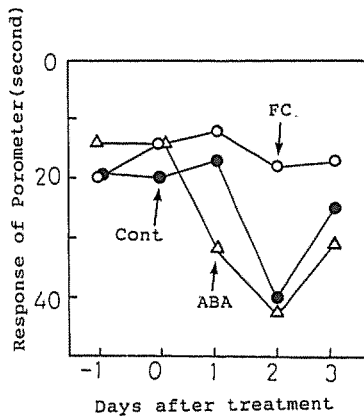


Fig. 1. Effect of fusicoicin (FC) and abscisic acid (ABA) on transpiration rate of citrus leaves. FC = 25 ppm; ABA=100 ppm.

け、対照区で見られた蒸散の減少は認められなかった。ABA 処理区では、処理翌日から急激な蒸散抑制を引き起こし、FC 処理区の50%、対照区の約70%の蒸散量となった。これらの結果から、FC には明らかに‘川野ナツダイダイ’実生葉に対して蒸散促進作用があるものと思われる。但し、対照区での2日目の蒸散低下が展着剤によって生じているとすれば、FC はこのような影響をも打ち消す作用を有すると考えられる。

次に、蒸散速度に及ぼす ABA と FC の相互作用を調査した (Fig. 2)。ABA 処理後の葉に FC を処理したところ、ABA の蒸散抑制作用は打ち消された。この FC 処理は1回で十分であり、2回反復処理しても効果は増加しなかった。また、FC による蒸散低下の抑制効果は夕方から夜にかけて顕著であり、FC は暗黒による気孔閉鎖を妨げているように思われた。暗黒下での気孔閉鎖が FC によって抑制されるメカニズムに関しては、後述する K^+ イオンが関与しているのではないかと考えられる。

FC 処理から24時間目まで経時的に気孔の開度を測定した (Fig. 3)。対照葉は蒸留水を処理した直後から気孔が閉じ始め、その後若干の変動はあったものの気孔開度は $4\mu\text{m}$ 前後であった。一方、FC 処理葉は3時間目には明らかに気孔が広げられ、その後12時間目までそれらの開度は徐々に増大し、それ以後24時間目まで $5\mu\text{m}$ 前後を維持し続けた。これらの値は、対照葉より有意に大

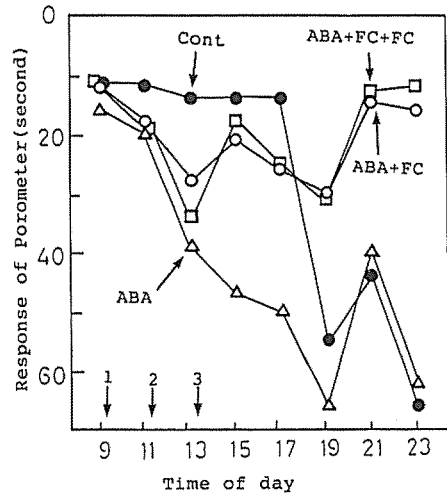


Fig. 2. Effect of fusicoicin (FC) on transpiration rate of citrus leaves pre-treated with abscisic acid (ABA). FC = 25 ppm; ABA = 100 ppm. Arrow 1 = ABA treatment; Arrow 2 = First FC treatment; Arrow 3 = Second FC treatment.

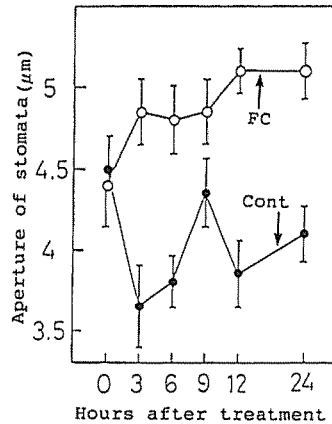


Fig. 3. Effect of fusicoicin (FC) on stomatal aperture of citrus leaves. FC=25 ppm. Vertical bars indicate standard error.

きな値であった。以上のことから、FC は‘川野ナツダイダイ’実生葉の気孔を速やかに広げて蒸散を促進させる作用があり、Fig. 2の結果を考慮にいと、この作用は ABA と拮抗的な生理作用であることが示唆された。

FC による気孔の開度増大が、エネルギー依存の生理的過程であることを更に検討した。一般に、光による気孔の開度の増大は孔辺細胞内への K^+ の流入の増加お

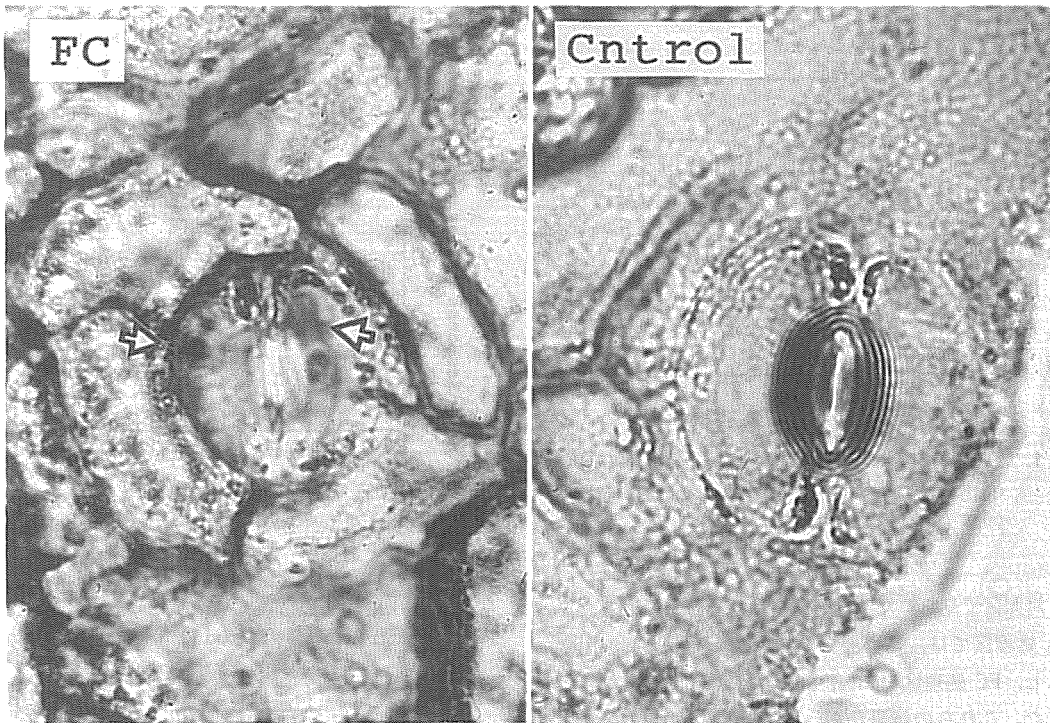


Fig. 4. Effect of fusicoccin (FC) on the concentration of potassium ions (arrows) in the stomatal guard cells. The leaves were sampled 6 hours after FC treatment. FC=25 ppm.

よびリンゴ酸合成の増加を伴い、これらの反応は ABA によって抑制されることが知られている⁶⁾。したがって、孔辺細胞中の K^+ の含量を組織化学的に検出することにより、FC が光の作用と同様なエネルギー依存の生理反応を引き起こしているか否かが判る。Fig. 4 の顕微鏡写真で示すように、FC で処理した葉の孔辺細胞中には

K^+ の存在を示す黒い沈殿が濃度・面積ともにより多く認められた。これらの結果を染色程度として以下のようにまとめた。すなわち、孔辺細胞内の K^+ の染色密度および面積を総合して、-, +, ++ の 3 段階に分けた。これらの符号は、それぞれ 1 孔辺細胞面積の約 20, 40 および 60% が染色されていたことを示す。1 処理区あたり

Table 1. Effect of fusicoccin (FC) on the concentration of potassium ions in the stomatal guard cells

Control		FC treatment	
Degree of staining*	Number of cells	Degree of staining*	Number of cells
-	18	-	7
+	9	+	12
++	3	++	11

* - = Cell stained about 20% of its area by Cobaltinitrite method,
 + = Cell stained about 40% of its area by Cobaltinitrite method,
 ++ = Cell stained about 60% of its area by Cobaltinitrite method.
 Details are described in the text.

30細胞について評価した。FC 処理しても K^+ を蓄積しない孔辺細胞はあったが、FC 処理区の染色程度の++、+がそれぞれ11, 12細胞だったのに対し、対照区ではそれぞれ3, 9細胞と明らかな差が認められ (Table 1), ‘川野ナツダイダイ’ 実生葉の孔辺細胞への K^+ の密度に及ぼす FC の強い作用が確認された。なお、FC にはカンキツ葉の光合成速度を促進する傾向も認められたが、統計的に有意差はなかった (データ省略)。

以上のように、FC は ‘川野ナツダイダイ’ 実生葉に対して、他で報告された数種の植物と同様明らかに強い生理作用を示し、FC によるカンキツ類のケミカルコントロールの可能性が示唆された。なお、この実験では1回の FC 処理で2日後に、2回反復処理では1日後に若い葉において萎縮が認められ、葉の萎縮に伴ない部分的にネクロシスも認められた (Fig. 5)。これらの葉害は、FC の有する気孔開度の促進作用により葉組織の脱水が

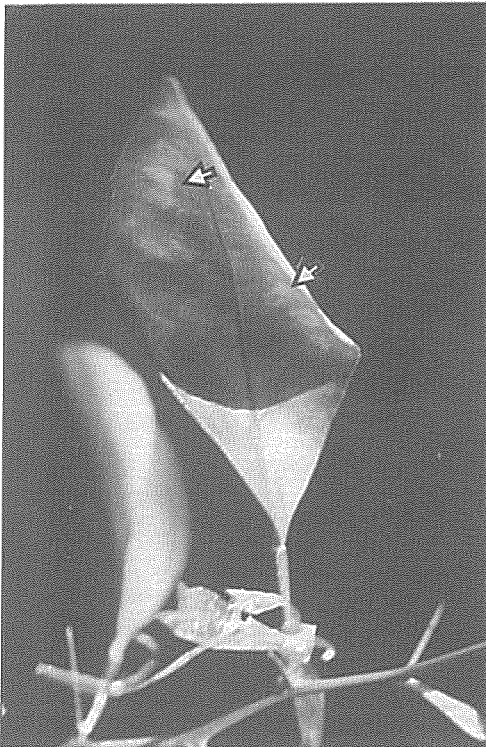


Fig. 5. Curling of young citrus leaves caused by fusiccoccin (FC) treatment. Necrotic spots (arrows) are also found.
FC=25 ppm.

生じ、著しい脱水部分で葉緑体・葉緑素の分解が起こった結果生じたものと推察された。したがって、実際栽培で FC によるケミカルコントロールを試みる場合、処理時期や処理濃度について十分検討する必要がある。

要 約

カンキツ類に対するフシコクシン (FC) の作用の基礎的知見を得る目的で、‘川野ナツダイダイ’ 珠心胚実生葉の蒸散、気孔開度および孔辺細胞中のカリウムイオンの濃度を調査した。

FC (25 ppm) 処理によって明らかに蒸散量は増加し、ABA (100 ppm) 処理では抑制された。さらに、ABA 処理後の葉に FC 処理を行なうことにより、ABA の作用は打ち消された。この FC 処理は1回で十分な効果を現し、2回反復処理してもその効果は増大しなかった。FC 処理後3時間目には明らかに気孔開度が増大し、その開度は12時間目まで徐々に増加し続けた。FC 処理葉の気孔の孔辺細胞内には明らかに K^+ がより多く認められ、FC は、エネルギーに依存した反応によって気孔開度を増大させていると推察された。

以上の結果から、FC がカンキツに対して強い生理作用を引き起こすことは明かであり、FC がカンキツ栽培における抗 ABA 剤、蒸散促進剤などといったケミカルコントロール剤として使用できる可能性が示唆された。

引用文献

- 1) GALLI, M. G., SPARVOLI, E. and CAROI, M. Comparative effects of fusiccoccin and gibberellic acid on the promotion of germination and DNA synthesis initiation in *Haplopappus gracilis*. *Plant Sci. Lett.* 5: 351-357 (1975).
- 2) LADO, P., RASI-CALDOGNO, F. and COLOMBO, R. Acidification of the medium associated with normal and fusiccoccin-induced seed germination. *Physiol. Plant.* 34: 359-364 (1975).
- 3) MANSFIELD, T. A. and JONES, R. J. Effects of abscisic acid on potassium uptake and starch content of stomatal guard cells. *Planta* 101: 147-158 (1971).
- 4) MARRÉ E., LADO, P., RASI-CALDOGNO, F. and COLOMBO, R. Correlation between cell enlargement in pea internode segments and decrease in the pH of the

- medium of incubation. I. Effects of fusicochin, natural and synthetic auxins and mannitol. *Plant Sci. Lett.* 1: 179-184 (1973).
- 5) PILET, P. E. Fusicochin and auxin effects on root growth. *Plant Sci. Lett.* 7: 81-84 (1976).
- 6) RASCHKE, K. The stomatal turgor mechanism and its responses to CO₂ and abscisic acid: observations and a hypothesis. In 'Regulation of cell membrane activities in plants', ed. Marré, E., Ciferri, O. pp. 173-183. Amsterdam, North-Holland (1977).
- 7) SQUIRE, G. R. and MANSFIELD, T. A. Studies of the mechanism of action of fusicochin, the fungal toxin that induces wilting, and its interaction with abscisic acid. *Planta* 105: 71-78 (1972).
- 8) YAMAGATA, Y. and MASUDA, Y. Comparative studies on auxin and fusicochin actions on plant growth. *Plant Cell Physiol.* 16: 41-52 (1975).