

発表番号 38

誘電緩和スペクトルによる植物の新耐塩性評価方法の開発

助成研究者 下町 多佳志 (長崎大学 環境科学部)

1. はじめに

本研究は、一般的な植物の耐塩性評価手法であった栽培実験や化学的分析手法に代わる耐塩性を有する有用作物品種の新規で簡便な選抜手法の開発を目的とするものである。

今回は、植物の新耐塩性評価方法開発のため、耐塩性や好塩性を有する植物を塩環境下で栽培し、塩が植物葉部の誘電緩和スペクトルにどのような影響を与えるか基礎的な調査を行った。

2. 研究方法

植物材料には、塩生植物のシチメンソウ(*Suaeda japonica*), 好塩性植物のアイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*), ビート(*Beta vulgaris*), 弱耐塩性植物のカボチャ(*Cucurbita pepo*), トマト(*Lycopersicon esculentum* Mill.)を用いた。シチメンソウは有明海で自生しているもの採取し測定した。他の植物材料は、エアコンにより昼夜気温を25℃とした実験室内で、光強度を成長点で約PPF200 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (植物育成灯, National FL40S-PG), 12h/12h(明期/暗期)として液耕栽培し、測定に用いた。液肥には、大塚1号および2号(大塚化学, 大阪)のA処方標準溶液(ECは約0.26 Sm^{-1} に調整)を用いた。培地はロックウール(50×50×50mm, 日東紡, 東京)を使用した。葉部の誘電緩和スペクトル(比誘電率 と比誘電損率 の0.3~3GHzでの周波数特性)の測定には、測定周波数域300kHz~3GHz, 分解能1Hzのネットワークアナライザ(Model HP8714ES, Agilent technologies Co., U.S.A)とOpen-ended coaxial probe (Agilent 85070D Dielectric Probe Kit, Agilent Technologies Co. U.S.A, 200MHz~20GHz)を使用した。水ポテンシャルの測定には、Dew point Microvoltmeter HR-33T(Wescor Co., U.S.A)およびSample Chamber C-52-SF(Wescor Co., U.S.A)を使用した。

3. まとめ

塩環境下での植物の生育反応による従来の耐塩性の評価分類法に代わる植物葉部の誘電緩和スペクトルの解析による新たな分類手法の開発を目的に、一定の塩環境下で液耕栽培した耐塩性の異なる植物の誘電緩和スペクトルを測定・解析した結果、(1)植物の種類によって誘電緩和スペクトルの変化パターンが異なること、(2)適応応答の定量的測定の可能性と、(3)植物の塩ストレス状態の簡便な診断手法としての有効性を確認した。

18

助成番号 0418

誘電緩和スペクトルによる植物の新耐塩性評価方法の開発

助成研究者 下町 多佳志 (長崎大学環境科学部)

1. 研究目的

本研究は、一般的な植物の耐塩性評価手法であった栽培実験⁽¹⁾や化学的分析手法⁽³⁾に代わる耐塩性を有する有用作物品種の新規で簡便な選抜手法の開発を目的とするものである。

植物は環境ストレスの適応応答過程において体内で浸透圧調節物質としてタンパク質、アミノ酸、無機塩類イオンなどの極性を持った分子を誘導・合成する。研究代表者らは、これまで、このような分子の電場に対する配向分極の時間遅れにより生じる誘電緩和スペクトルの変化を捉えることによって、植物の水ストレスや塩ストレス適応応答を非破壊的に検出できることを示した⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

今回は、植物の新耐塩性評価方法の開発のため、耐塩性や好塩性を有する植物を塩環境下で栽培し、塩が植物葉部の誘電緩和スペクトルにどのような影響を与えるか基礎的な調査を行った。

2. 研究方法

2.1 材料

今回測定した植物材料は、塩生植物のシチメンソウ(*Suaeda japonica*)、好塩性植物のアイスプラント(*Mesembryanthemum crystallinum*)、ビート(*Beta vulgaris*)、弱耐塩性植物のカボチャ(*Cucurbita pepo*)、トマト(*Lycopersicon esculentum* Mill.)である。

シチメンソウは実験室で栽培することが困難なため、有明海で自生しているもの採取し測定した。他の植物材料は、エアコンにより昼夜気温を25°Cとした実験室内で、光強度を成長点で約PPF200 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (植物育成灯, National FL40S-PG), 12h/12h(明期/暗期)として液耕栽培し、測定に用いた。液肥には、大塚1号および2号(大塚化学, 大阪)のA処方標準溶液(ECは約0.26 Sm^{-1} に調整)を用いた。培地はロックウール(50×50×50mm, 日東紡, 東京)を使用した。

生長の早いカボチャは播種後2週目に液肥中のNaCl濃度を100mmol/Lとして塩ストレス状態にして2週適応後、4週目に誘電緩和スペクトルを測定した。生長の遅いアイスプラントは6週目にNaCl濃度を300mmol/Lとして12週目に測定した。他の材料は4週目にNaCl濃度が100mmol/Lになるよう加え、8週目に測定した。

2.2 測定方法

葉部の誘電緩和スペクトル(比誘電率 ϵ' と比誘電損率 ϵ'' の 0.3~3 GHz での周波数特性)の測定には,測定周波数域 300 kHz~3 GHz,分解能 1 Hz のネットワークアナライザ(Model HP8714ES, Agilent technologies Co., U.S.A)と Open-ended coaxial probe (Agilent 85070D Dielectric Probe Kit, Agilent Technologies Co. U.S.A, 200 MHz~20 GHz)を使用した。Fig. 1 に測定システムを示す。同様の方法を用いた水ストレスに対するトマトの適応応答の非破壊的検出に関する研究で⁽⁶⁾, トマト葉部の複素誘電率と, 粉碎したトマト葉部の測定値が同一傾向を示したことから, 今回は粉碎した葉部を測定に使用した。

水ポテンシャルの測定には, Dew point Microvoltmeter HR-33T(Wescor Co., U.S.A)および Sample Chamber C-52-SF(Wescor Co., U.S.A)を使用した。サンプルチャンバは, 25°C に設定したインキュベータ内に設置した。測定は,パンチした葉をサンプルチャンバに挿入し 2 時間後に測定した。

3. 研究結果および考察

Fig. 2 に有明海沿岸で採取した塩性植物 *Suaeda* (シチメンソウ) 葉部の誘電緩和スペクトルを示す。同様に, 液肥に NaCl を加えることによって, 塩ストレス状態とした時, どのように誘電緩和スペクトルが変化するか好塩性植物のアイズプラントとビート, 弱耐塩性植物のトマトとカボチャの誘電緩和スペクトルを, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, に示す。植物の種類によって誘電緩和スペクトルが異なることがわかる。また, 塩ストレスによって葉部の複素誘電率が増加するもの, 減少するもの, ほとんど変化しないものがあることがわかる。これらの測定結果から, 同じ耐塩性に分類されている植物でも, 誘電緩和スペクトルの変化傾向が異なることがわかった。塩ストレス処理で, 誘電緩和スペクトル上で共通した変化は, 誘電損率の変化である。植物の耐塩性の強さにかかわらず, 増加量は植物によって異なるが, どの植物も葉部誘電損率を増加させた。液肥中の NaCl を吸収したことが原因と考えられる。

液肥に NaCl を加えることによって植物葉部の水分量はほとんど変化せず対象区の植物に対して平均で-0.6%減少し, 最大でも 2%の水分量の変化にすぎなかった。誘電率が水分量と強い相関関係を有することは, マイクロウェーブ水分計の原理にもなっているが, 水分量の変化以上に誘電率や誘電損率は変化しており, 植物の塩ストレス適応応答にともなう植物の物理化学的な変化が誘電緩和スペクトルを変化させたと考えられる。誘電損率が低周波数域で周波数に反比例的に増加する現象は, 強電解質イオンの存在を示し⁽²⁾, 植物が液肥から Na⁺や Cl⁻を吸収していることを示唆している。

Fig. 3~Fig. 6 で示したように, 葉部の水分量がほとんど変化しない状態で, 誘電率と誘電損率が変化するという事は, 植物体の水分が含有している複素誘電率を変化させる要因となる物質の変化を意味する。このことは, 誘電率を減少させるとともに誘電損率を

増加させる強電解質のイオンの増加と、誘電率は増加させるが誘電損率にはほとんど影響を与えないアミノ酸様の物質の生成を示唆する。一般に、水溶性の材料では尿素をのぞいては、アミノ酸とタンパク質は例外的に誘電率を増加させる効果をもつ⁽⁴⁾。塩ストレスにより、葉部の水分量はほとんど変化していないが、誘電率および誘電損率が増加あるいは減少傾向を示した。植物によって塩ストレスによる誘電緩和スペクトルの変化の傾向が異なるのは、塩ストレスにより誘導合成される適応物質の量比や生成パターンの違いを示唆していると考えられる。

Fig. 7 と Fig. 8 に塩ストレスに対する植物の誘電緩和スペクトルの変化を、Cole-cole plot 上に示す。様々な耐塩性と塩環境に対する適応応答を持つ植物も、Cole-cole plot 上では、あたかも塩性植物であるシチメンソウの誘電緩和スペクトルの方へ、近づこうとしているかのようである。たとえば塩ストレスを受けていないトマトは約 50~55 の誘電率、約 10~50 の誘電損率の範囲に存在するが、塩ストレスによって誘電率で約 10、誘電損率で約 25 増加しシチメンソウの方へ誘電的特性が移動した。同様に、ほかの植物もシチメンソウの誘電緩和スペクトルに接近する傾向を示した。

塩ストレスに対する適応応答によって、植物葉部の誘電緩和スペクトルが変化することがわかった。一方、水ストレスや塩ストレス環境下にある植物の状態の指標として水ポテンシャルが知られている。複素誘電率を測定した周波数範囲 0.3~3 GHz での誘電率および誘電損率の平均値と水ポテンシャルの関係を Fig. 9 および Fig. 10 に示す。植物の種類によって、固有の水分量は異なるが、対象区および塩ストレス区どちらも、誘電率が増加すると水ポテンシャルが減少する共通した傾向が観察された。特に塩ストレス処理区では、誘電率のわずかな増加で、水ポテンシャルが大きく減少する傾向が見られた。塩ストレスに対して、植物は誘電率をわずかに増加させ、水ポテンシャルは大きく減少させるような物質を生成していることを Fig. 9 は示唆しているのかもしれない。Fig. 10 は、誘電損率と水ポテンシャル間にはほぼ直線的な関係があることを示している。今回の測定結果からは、植物葉部の誘電損率が約 35 以上の場合、その植物は塩ストレスを受けている(塩ストレス環境下に生息している)ことを示唆していると考えられ、塩ストレス状態の一つの診断手法としての有効な可能性も示された。

4. 今後の課題

本研究では、塩ストレス環境下の生育反応によって植物の耐塩性を、塩生植物、好塩性植物、耐塩性植物、弱耐塩性植物、感受性植物に分類する方法⁽¹⁾に変わる誘電緩和スペクトルの違いによる耐塩性植物の簡便な分類手法の開発を目指した。

本年度の研究では、生育反応による植物の耐塩性の評価方法に変わる誘電緩和スペクトルによる簡便な耐塩性評価方法の確立までは至っていないが、今回得られた成果として、植物の種類によって塩ストレスに対する誘電緩和スペクトルの変化パターンが異なること、塩ス

トレスに対する適応応答の定量的な測定可能性が示されたこと,誘電緩和スペクトルの測定により,対象植物が塩ストレス状態にあるか否かの簡便な診断手法となり得ること示唆する研究結果が得られたことをあげることができる。

本研究で使用した0.3~3.0 GHzの測定周波数帯で捉えることができる現象は,植物体の水分中に含まれる物質のイオン伝導や電気双極子による一部の緩和現象にすぎないが,誘電率の変化からアミノ酸類と強電解質イオン量の増減が検出され,誘電損率の変化からはイオン量の増減が検出されることで,植物のストレス適応応答の新たな非破壊的かつ定量的に検出できるこれまでにない手法として有効であることが示唆された。

植物体は水分,生体高分子であるセルロース,本来含有する化学的成分,ストレスによって誘導・合成された適応物質(電解質,アミノ酸類,タンパク質類)などで構成される。それらの構造中には,水と親和性の大きなペプチド結合,アミノ基(-NH₂),カルボキシル基(-COOH),水酸基(-OH)が含まれていることから,植物体内の水分も自由水のみではなく結合水としても存在し,さらにストレスにより生成した適応物質も複合的に作用することで,複数の物質による誘電分散現象が重なりあうことで誘電緩和スペクトルの変化が生じていると考えられる。このことから,水の緩和周波数である約20 GHz以上の測定周波数域で,誘電緩和スペクトルを解析することによりこれらの物質の複合的相互作用を把握することによって,植物のストレス適応プロセスの物理化学的な観点からの解明が期待できる。

これまでの研究成果と,平成16年度ソルト・サイエンス助成研究で得られた成果によって,平成17年度科学研究費補助金(基盤研究(B))交付の内定を受けることができ,本年度中には大幅に測定周波数を拡大して,最大50 GHzの周波数範囲で誘電緩和スペクトルの測定可能なシステムを導入できることになった。本年度の研究成果をふまえて,誘電緩和スペクトルからみた植物の好塩性や耐塩性の新たな評価方法の開発を行いたい。

参考文献

- (1) Greenway, H. and Munns, R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalpophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:149-190.
- (2) Hewlett Packard Application Note 1217-1. 1992. Basis of measuring the dielectric properties of materials.
- (3) Matsuzaki F., Zhang J., Takao Y., Shimomachi T. and Yamazaki S, Changes in the Cellullar Components of Sugar Beet under Salt Stress , *BUNSEKI KAGAKU*,52: 833-837, 2003.
- (4) Pethig, R. 1984. Dielectric properties of biological materials: Biophysical and Medical Applications. *IEEE Transactions on Electrical Insulation*, Vol. EI-19, No. 5, October: 453-474.
- (5) Shimomachi, T., Okamura, N., Takemasa, T., and Takakura, T. 2001. Nondestructive detection of water stress in tomato plants by microwave sensing. *Environ. Control in Biol.*,

39: 17-25.

- (6) Shimomachi, T., Takemasa, T., Kurata, K., and Takakura, T., 2004. Nondestructive detection of water stress in tomato plants by microwave sensing(2). *Environ. Control in Biol.*, 42: 83-90.
- (7) Shimomachi, T., Ou, S., Ichimaru, Y. Cho, S., Takemasa, T., Yamazaki, S. and Takakura, T., 2005, Nondestructive Detection of Salt Stress in Tomato Plants using Microwave Sensing, *Environ. Control in Biol.*, 43: 33-41.

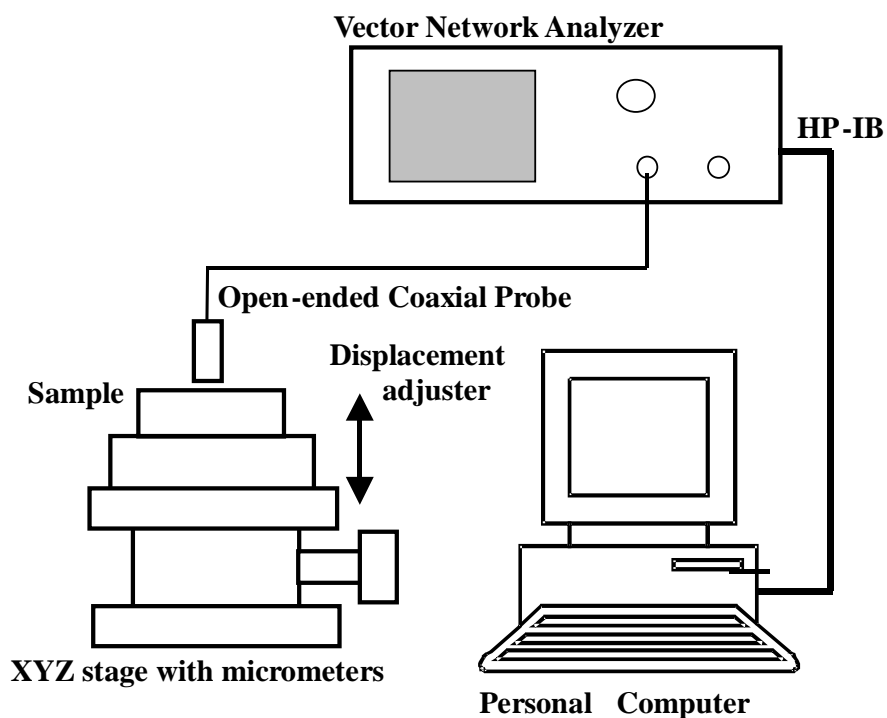


Fig.1 Schematic diagram of the dielectric properties measurement system.

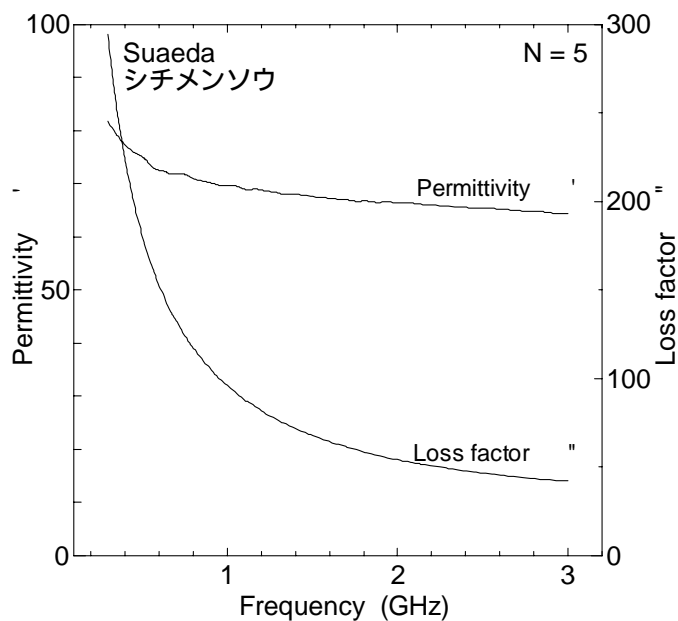


Fig. 2 Dielectric properties of *Suaeda* leaves.

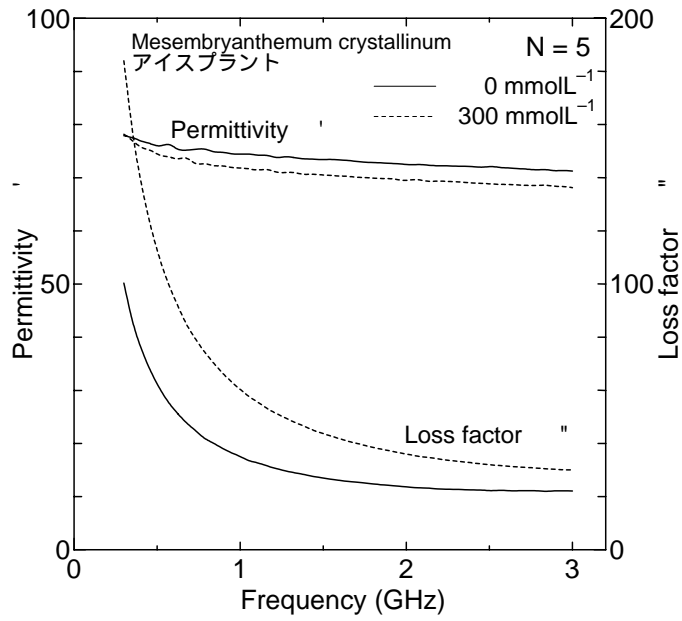


Fig. 3 Effects of NaCl concentration in nutrient solution on leaves dielectric properties of *Mesembryanthemum crystallinum*.

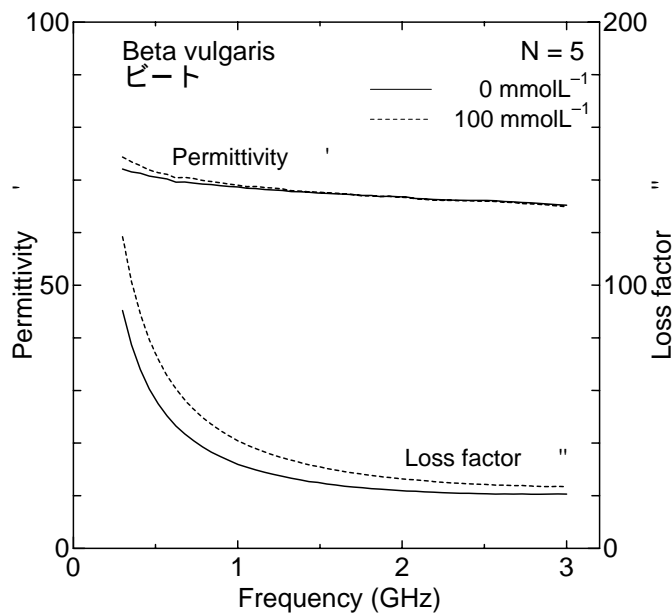


Fig. 4 Effects of NaCl concentration in nutrient solution on leaves dielectric properties of *Beta vulgaris*.

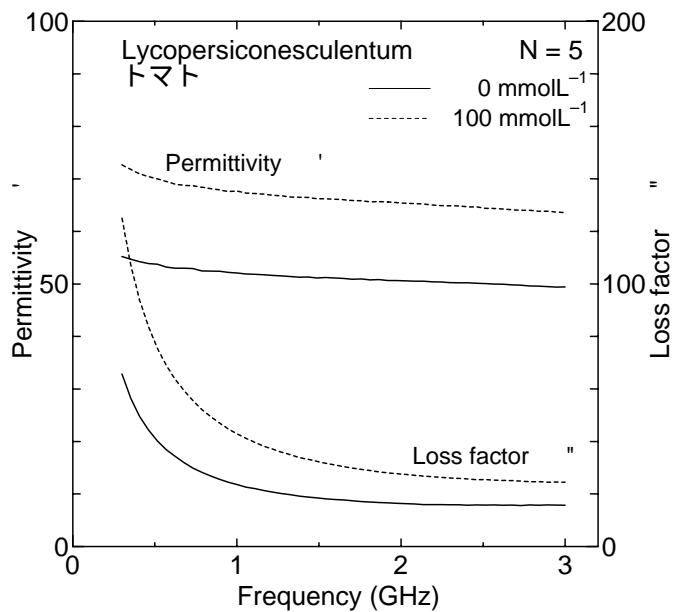


Fig. 5 Effects of NaCl concentration in nutrient solution on leaves dielectric properties of *Lycopersicon esculentum*.

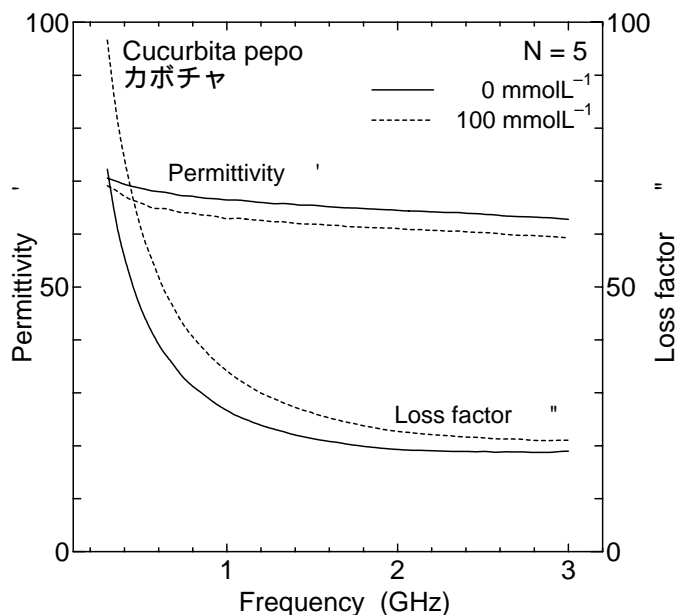


Fig. 6 Effects of NaCl concentration in nutrient solution on leaves dielectric properties of *Cucurbita pepo*.

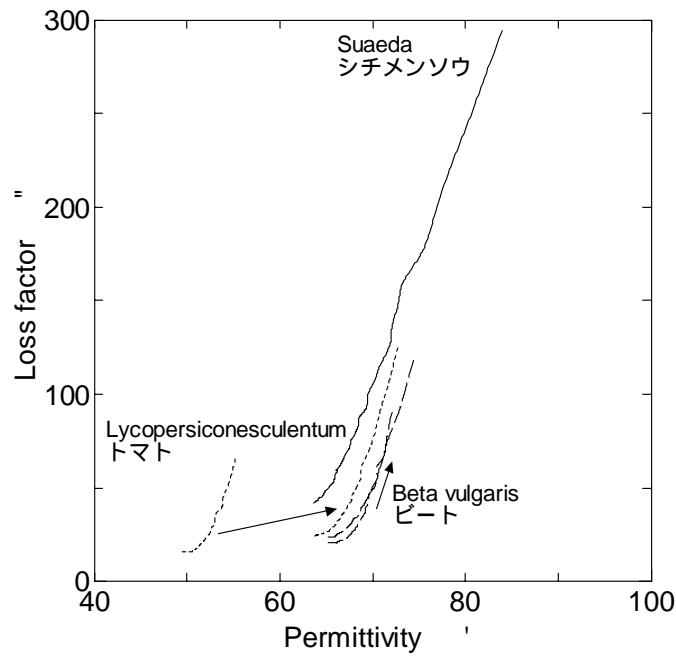


Fig. 7 Changes of dielectric properties in plant leaves affected by salt stress on cole-cole plots.

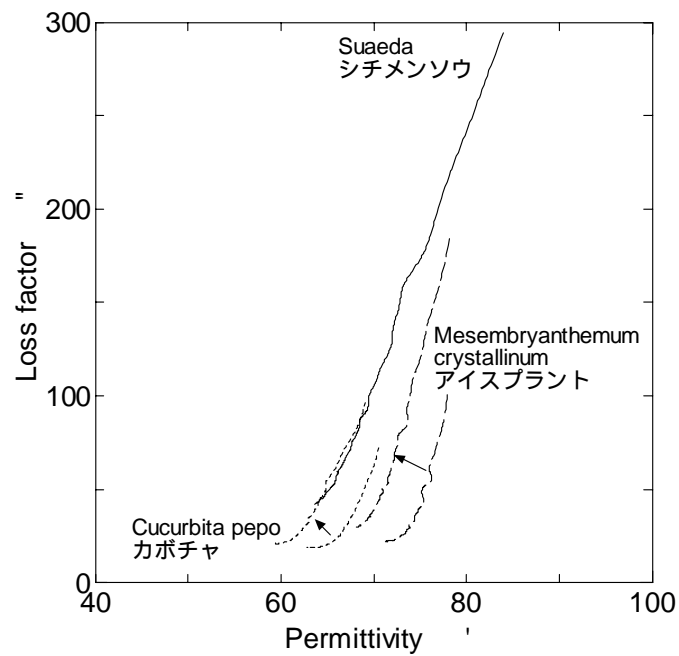


Fig. 8 Changes of leaf dielectric properties in plant leaves affected by salt stress on cole-cole plots.

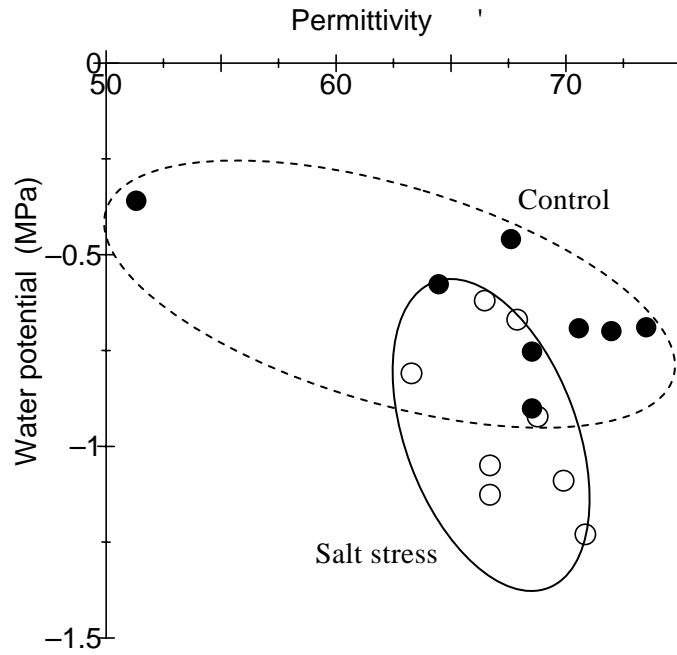


Fig. 9 Relationship between water potential and permittivity of plant leaves.

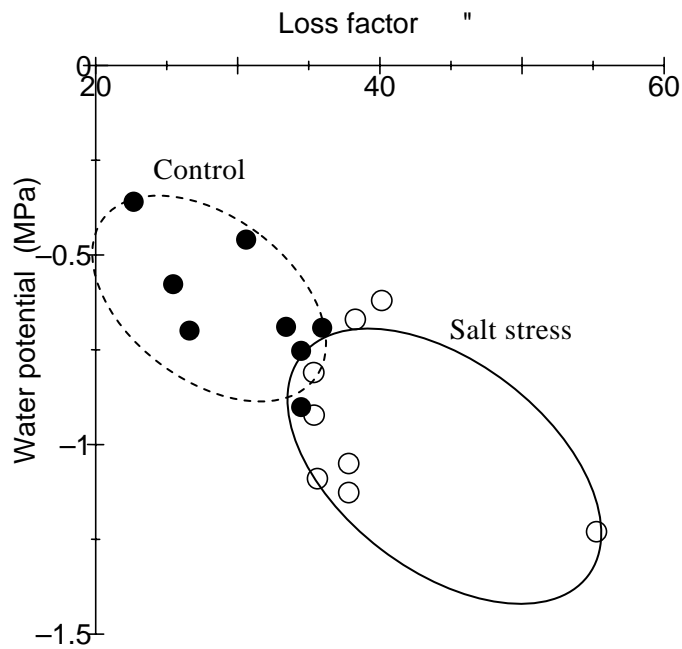


Fig. 10 Relationship between water potential and loss factor of plant leaves.

Development of the new salinity tolerance evaluation method for plants using dielectric relaxation spectrum

Takashi Shimomachi

College of Environmental Studies, Nagasaki University

Summary

The objective of this research is to develop a new salinity tolerance evaluation method for plants using microwaves to nondestructively sense physiochemical changes in plants arising from adaptation responses to the environment, which appear as changes in the dielectric relaxation spectra. The physiological adaptation response to environmental stress of a plant can induce changes in physiological and physical conditions of the plant. These changes influence the dielectric properties of the plant, which can be detected by measuring complex dielectric properties of plant materials. The dielectric properties of plants leaves during salt stress at NaCl concentrations of 0 and 100 mmol L⁻¹ in nutrient solution were measured with an open-ended coaxial probe from 0.3 to 3 GHz, as well as changes in water content and water potential which reflect the physiological condition of the plant. Experimental results showed the potential of microwave sensing as a method for monitoring adaptation responses in plants under salt stress. The dynamic adaptation responses of plants to salt stress can be detected non-invasively by microwave sensing which detects the changes in complex dielectric properties of the plant.