

The Comparison of Replica-Methods to Observe Stomata

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-05-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 細谷, 夏実, 齋藤, 弥夕 メールアドレス: 所属:
URL	https://otsuma.repo.nii.ac.jp/records/6439

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



植物の気孔観察に用いられる複数のレプリカ法の比較検討

細谷 夏実*, 齋藤 弥夕*

要 約

学校現場などで植物の気孔を簡便に観察する際には、レプリカ法（スンプ法）が用いられている。

本研究では、生きた気孔の状態を反映し、かつ簡便・鮮明に気孔が観察できるかという点について、汎用されている複数のレプリカ法について、比較検討することとした。その際、歯科用のシリコンラバーを使った方法も検討に加えた。また、葉の表皮を剥いで直接観察する方法も同時に行った。

その結果、レプリカ像の鮮明さや気孔の開閉状況は、マニキュア・液体絆創膏・シリコンラバーの間で大きな違いは見られなかった。

今回の検討から、汎用されているマニキュアや液体絆創膏を用いた簡便なレプリカ法でも、気孔の開閉状態などの概要をつかむには十分であることが明らかになった。

1. はじめに

植物のからだのつくりとはたらきを知る学習において、葉の気孔は好適な題材の一つである。顕微鏡さえあれば、比較的簡単に観察できることから、気孔の観察実験は小学校や中学校の理科の現場でも行われている。

現在、学校現場で行われている気孔の一般的な観察方法としては、大きく分けると、(1) 表皮を剥いで直接観察する、(2) レプリカをとって間接的に観察する、という二つの方法がある。

(1) の方法は、葉の表皮をピンセットなどで剥がし取り、そのままスライドガラスにのせて観察

する方法である（井上, 1988）。気孔を直接観察するため、孔辺細胞の中の葉緑体なども観察でき、最も望ましい方法と言えるであろう。しかし、表皮を剥がしやすい植物は、ムラサキツユクサなど、いくつかの植物に限られている。また、表皮を剥がす過程（刺激）で気孔の開閉状態が変化する可能性が考えられている（日本植物生理学会 HP）。

(2) のレプリカ法は、表皮の鋳型（レプリカ）をとり、それを顕微鏡で観察する方法であり、スンプ法（Suzuki's Universal Micro-Printing method）やシリコンラバー法が知られている。

スンプ法は、セルロイド板の表面にスンプ液（溶剤）を塗って溶かし、それを観察対象の表面に押

*大妻女子大学 社会情報学部 社会情報学科 環境情報学専攻

し付けて固めて型を写し取り、観察する方法である。元々は鈴木（1930）が布地繊維の表面形状観察のために開発した方法であり、光透過性のない試料や薄い観察片を得られない試料でも、その表面形状を簡便に顕微鏡観察できる方法である¹⁾（鈴木，1955）。この方法は、布地繊維表面のみならず、皮膚表面、金属表面や気孔の観察など、様々な試料の観察に広く用いられている（石神，1932、谷口，1933、木島，1962）。近年は、セルロイド板を使用せず、マニキュアや液体絆創膏、瞬間接着剤などを用いた簡便な方法が行われていることが多い（静岡県総合教育センター HP、臼井，1997、広瀬，1992）。スンプ法は、このように表皮を剥がせない葉にも応用でき、また、一枚の葉から何枚ものレプリカをとることが可能なので、学校現場のように多数の児童生徒に手軽に気孔を観察させるには好適な方法である。一方で、スンプ液やマニキュアなどに含まれている有機溶媒により、気孔の開閉に影響が出る可能性が考えられている（日本植物生理学会 HP）。

同じくレプリカ法の一種であるシリコンラバー法は、歯科医が歯型を取る際に用いる歯科用のシリコンラバー（デンタルラバー）を使って表皮の一次レプリカを取り、そのレプリカを元にマニキュアで二次レプリカを作って観察する方法である（Sampson, 1961）。スンプ法では一次レプリカを観察するため、観察像はもともとの試料（今回であれば、気孔）とは凹凸が逆転したものとなる。一方、シリコンラバー法では2次レプリカを観察するため、観察像の凹凸は、もともとの試料と同じとなる。シリコンラバーはヒトの口腔内で使用するものであるため、気孔の形態や開閉状態に有害な影響を及ぼす可能性のある物質を含まず、自然状態での気孔の様子を観察することができる。日本植物生理学会のホームページでも推奨されている方法である（日本植物生理学会 HP）。しかし、歯科用のシリコンラバーには様々な種類があり、価格も高い。

このように、レプリカ法においては、自然状態の気孔の様子を反映することと、簡便に行うことを両立させるのは難しいと考えられてきた。

本研究では、汎用されている複数のレプリカ法について、本来の生きた気孔の状態を反映しているか、簡便・鮮明に気孔が観察できるか、という点について注目し、比較検討を行った。具体的には、シリコンラバー法も含めた複数のレプリカ法で同時に観察試料を作製し、さらに表皮を剥いで直接観察する方法も併用しながら、得られる気孔の観察像の比較検討を行うこととした。

2. 実験材料と方法

2-1 実験材料

実験に使用した植物及びレプリカ法の材料、使用機器類は以下の通りである。

- ・ムラサキゴテン（セトクレアセア）（図1）
（*Tradescantia pallida* 'Purpurea'）

ツクサ科ムラサキツクサ属の観葉植物で多年草である。入手しやすく、育てやすい。今回は、ペットエコ&ザ・ガーデン楽天市場店（有限会社ヨネヤマプランテーション）から購入したものを使用した。

- ・マニキュア

ダイソー（株式会社大創産業）で購入した。

成分：未記載のため不明

- ・トップコート

無印良品（株式会社良品計画）で購入した。

成分：酢酸エチル、酢酸ブチル、イソプロパノール

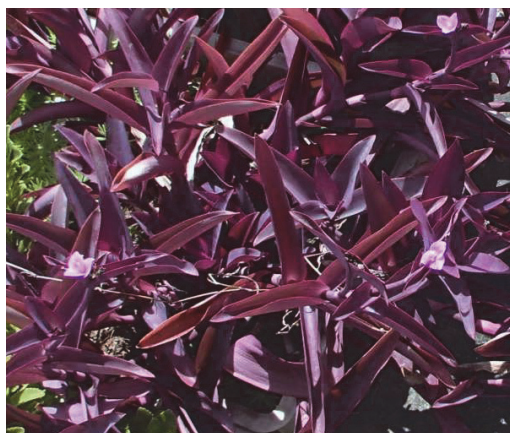


図1 ムラサキゴテン

ル、(酢酸 / 酪酸) セルロース、安息香酸スクロース、(無水フタル酸 / 無水トリメリト酸 / グリコールズ) コポリマー、スクワラン、カミツレ花エキス、モモ葉エキス、カンフル、水、BG、紫 201

・グロストッップコート

無印良品 (株式会社良品計画) で購入した。
成分：酢酸エチル、酢酸ブチル、安息香酸スクロース、イソプロパノール、(酢酸 / 酪酸) セルロース、(無水フタル酸 / 無水トリメリト酸 / グリコールズ) コポリマー、スクワラン、カミツレ花エキス、モモ葉エキス、カンフル、水、BG、紫 201

・液体絆創膏

エキバン A (タイヘイ薬品株式会社) を用いた。
成分：ピロキシリン、dl-カンフル、ベンジルアルコール、ヒマシ油、酢酸エチル、酢酸ブチル

・歯科用シリコンラバー：

ジーシーフュージョン II エクストラウォッシュタイプ (株式会社ジーシー) を用いた。

成分：《ベース (基材)》ビニルポリシロキサン、ポリエーテル化合物、二酸化けい素 《キャタリスト (触媒)》ビニルポリシロキサン、二酸化けい素、白金触媒

使用時に基材を触媒と混合することで硬化を引き起こす。2～3 分で硬化が完了するタイプである。歯科用のシリコンラバーには多くの種類があるが、今回、日本歯科大学生命歯学部生理学講座の佐伯周子准教授と井出良治助教の協力で、気孔という細かい構造の型を迅速にとるのに適したシリコンラバーとして、上記製品を選定した。

・ミキシングペーパー

デプロ (佐々木株式会社) を用いた。実験に用いる一般的な薬包紙で代用可能である。

・酢酸エチル (和光純薬工業株式会社)

マニキュアの希釈に用いた。

・フシコクシン (fusicoccin) (Sigma-Aldrich Japan)

菌類由来の生理活性物質で、気孔を開く作用がある (Turner 1969, Squire 1972)。

・倒立顕微鏡：NIKON ECLIPSE TS100、NIKON

TMS (株式会社ニコン)

- ・顕微鏡用カメラ：NIKON COOLPIX 4500、NIKON COOLPIX 995 (株式会社ニコン)

2-2 レプリカ法

2-2-1 マニキュアを用いた気孔のレプリカ法

ここでは、説明を簡略化するために、マニキュア、トップコート、グロストッップコートをまとめて「マニキュア」と表すこととする。

- 1) レプリカをとる葉の裏側に、マニキュアを付属のハケで薄く塗る。
- 2) そのまま 5～7 分程度放置して、マニキュアを十分乾かす。
- 3) マニキュアが十分乾いたことを確認したら、上からセロハンテープを貼り付ける。
- 4) セロハンテープをゆっくり剥がす。
- 5) セロハンテープをスライドガラスに貼り付け、顕微鏡で観察する。

2-2-2 液体絆創膏を用いた気孔のレプリカ法

- 1) 液体絆創膏を小型の葉さじ (へら状) の先に少量とり、葉の裏側に薄く塗る。
- 2) そのまま 3～5 分程度放置して、液体絆創膏を十分乾かす。
- 3) 液体絆創膏が十分乾いたことを確認したら、上からセロハンテープを貼り付ける。
- 4) セロハンテープをゆっくり剥がす。
- 5) セロハンテープをスライドガラスに貼り、顕微鏡で観察する。

2-2-3 シリコンラバーを用いた気孔のレプリカ法

- 1) ミキシングペーパーの上にシリコンラバーのベース (基材) とキャタリスト (触媒) をそれぞれ少量出し、混合する (図 2a, b)。なお、すぐに硬化が始まるので、使用直前に手早く混合する。
- 2) レプリカをとる葉の裏側に混合したシリコンラバーを薄く塗る (図 2c)。
- 3) そのまま 7～10 分程度放置し、シリコンラバーが十分硬化するのを待つ。

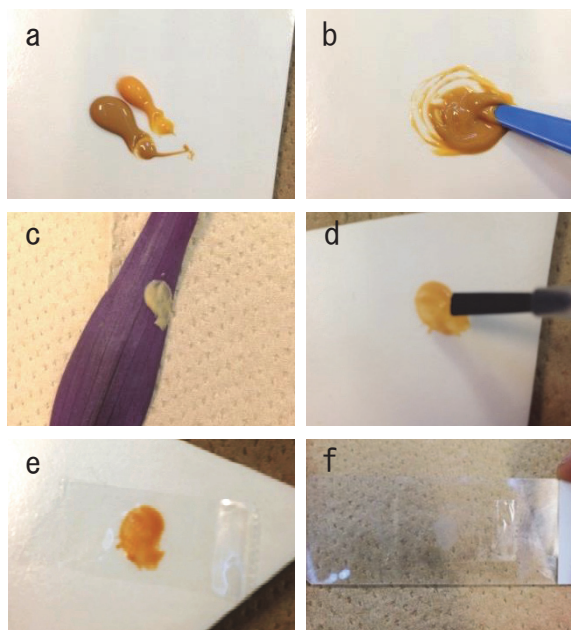


図2 シリコンラバーを用いたレプリカ法の手順（詳細は本文参照）

- 4) シリコンラバーが硬化したことが確認できたら、ピンセットでゆっくり剥がす。
- 5) 剥がしたシリコンラバー（一次レプリカ）にマニキュアを薄く塗る（図2d）。
- 6) そのまま5～7分程度放置し、マニキュアを十分乾かす（二次レプリカ）。
- 7) マニキュアが十分に乾いていることが確認できたら、上からセロハンテープを貼り付ける（図2e）。
- 8) セロハンテープをゆっくり剥がす。
- 9) セロハンテープをスライドガラスに貼り、顕微鏡で観察する（図2f）。

2-3 一枚の葉における場所の違いの検討

ムラサキツユクサの葉の10箇所から、表皮を剥がし、そのまま気孔を観察した。

2-4 開閉状態の異なる気孔の観察方法

複数のレプリカ法による気孔観察時に、自然の状態が反映できているか、また、得られたレプリカ像の鮮明さに違いがあるかどうか、を比較するため、閉じている気孔と開いている気孔でレプリ

カをとり、観察を行った。

2-4-1 閉じている気孔の観察

ムラサキゴテンの葉をとり、シャーレに入れ、暗所で丸一日放置した。その後、葉の先端部（半分より先端の部分）について、表皮を剥がして直接観察する方法（以下、「表皮」と略す）、及びマニキュア・液体絆創膏・シリコンラバーを用いたレプリカ法で得られた気孔の像を観察した。

2-4-2 開いている気孔の観察

A. ムラサキゴテンの鉢に水を与え、午前11時から午後2時まで約3時間窓際に置き、日光にあてた。その後、2-4-1と同様に、4種類の方法で気孔を観察した。

B. ムラサキゴテンの葉をフシコクシン水溶液（10 μ M）に浸し、約2時間放置した。その後、2-4-1と同様に、4種類の方法で気孔を観察した。

3. 結果と考察

3-1 一枚の葉において場所による気孔の開閉状態の違いがあるかどうかについて

気孔の観察を行うに当たり、まず、一枚の葉の中で、場所によって気孔の開閉状態に違いがあるかどうかについて、ムラサキゴテンの葉を用いて検討を行った。

ムラサキゴテンの葉の裏側全体を大まかに10ヶ所に区分し（図3）、それぞれの部分から表皮を剥がし、そのまま直接、顕微鏡で気孔の観察を行った。

その結果、気孔の開閉状況は、葉の長軸方向に対して左右で大きな違いは見られなかったものの、葉の先端部（半分より先端の部分：図中で番号の小さい部分）に比べ、葉の基部（半分より茎

に近い部分：図中で番号の大きい部分）では気孔が閉じる傾向があった（図4）。

このことから、レプリカ法の比較の際には、開いている気孔の多い葉の先端部を材料として観察を行うこととした。また松垣（私信）によると、一般的に植物は古い葉より新しい葉の方が気孔開閉をより活発に行う傾向があるとのことである。そのため、実験の際は、ムラサキゴテンの古い葉（大きい葉）ではなく、若い葉（小さめの葉）を使用することとした。

3-2 表皮を剥がしたものとレプリカの観察像の比較

3-2-1 閉じている気孔の観察

2-4-1 に述べた方法で得られた、閉じていると考

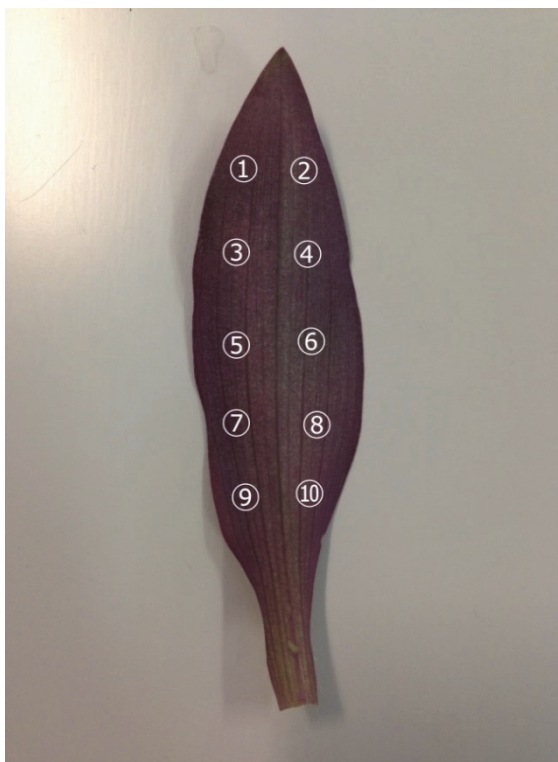


図3 葉の区分（10ヶ所）
bar: 3cm

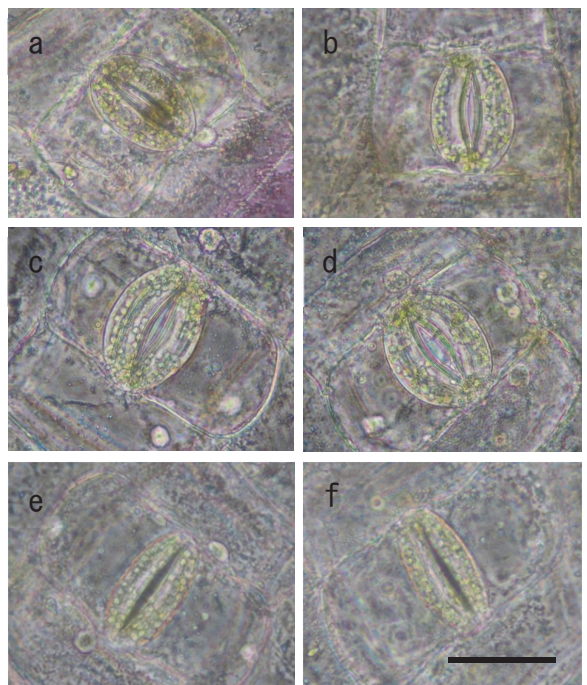


図4 葉の区分ごとの気孔の開閉の様子

a: ①の位置の気孔、b: ②の位置の気孔

c: ⑨の位置の気孔、d: ⑩の位置の気孔

e: ⑨の位置の気孔（閉じ気味のもの）、

f: ⑩の位置の気孔（閉じ気味のもの）

bar: 50 μ m

えられる気孔について、表皮を剥がしてそのまま観察する（表皮）、及び、マニキュア、液体絆創膏またはシリコンラバーでレプリカを取って観察する、という4種類の方法で観察像の比較検討を行った。

なお、マニキュアは、購入してから時間が経つにつれて液の粘性が上がる。そのため、粘性が上がった場合は、使用の際に酢酸エチルで薄めて使用した。

また、液体絆創膏は元からマニキュアに比べて液の粘性が高く、そのまま使用するとレプリカに気泡が入ってしまうことが多い。そのため、使用する都度、酢酸エチルで使用しやすい濃度になるまで薄めた。

マニキュアはダイソーのものと無印良品のものを使用した。無印良品の透明マニキュアにはトップコートとグロストップコートの2種類があり、成分表示では含まれる成分に若干の違いがみられた。そのため、これらのマニキュアの間で気孔のレプリカ像に違いがみられるかどうかについて、予め比較を行った。結果として、それぞれのマニキュアでとったレプリカの観察像には特に違いが見られなかった。そのため、以後の実験では特にこれら3種類を区別せず、適宜使用して実験を行った。

2-4-1に述べた方法で得られた、閉じていると考えられる気孔について、マニキュア、液体絆創膏、シリコンラバーの3種類の気孔レプリカ像を観察したところ、表皮を剥いで観察した場合も含めて、すべての観察像で、閉じている気孔が確認された（図5）。

このことから、2-4-1の条件下では、ムラサキゴテンの葉の気孔は生きた状態でも閉じていると考えられる。

3-2-2 開いている気孔の観察

次に、2-4-2のAで述べたように、水と日光を十分に与えることによって、気孔が開いていると考えられる葉について、表皮、マニキュア、液体絆創膏、シリコンラバーの4種類の方法でレプリカ像をとり、観察した（図6）。

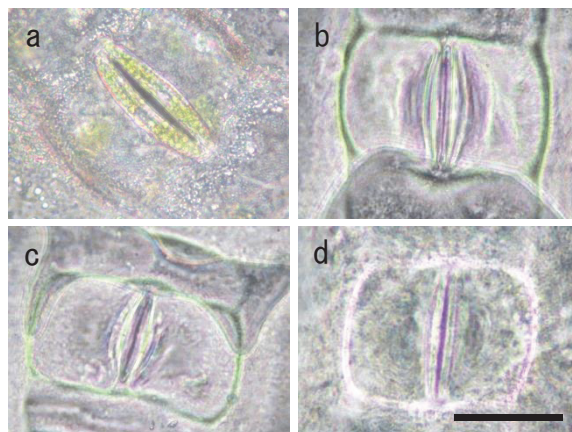


図5 閉じている気孔の観察
a:表皮の気孔、b:マニキュアを用いたレプリカ、
c:液体絆創膏を用いたレプリカ、d:シリコンラバーを用いたレプリカ。
bar: 50 μ m

その結果、いずれの方法で観察した場合でも、開いている気孔が観察された。ただし、マニキュアと液体絆創膏でとったレプリカでは、表皮を剥がして直接観察した場合に比べて、気孔は開いているものの、その開口度はやや低く、また、気孔の両端あるいは周囲に筋のようなものが見られる場合が多かった（図6b～e）。一方、シリコンラバーのレプリカにはそうした筋のようなものは観察されず、気孔の開口度も表皮との違いがほとんど見られなかった（図6f）。

3-2-3 フシコクシン処理により開いた気孔の観察

2-4-2のBで述べたように、フシコクシン水溶液（10 μ M）処理により気孔が開いていると考えられる葉について、先端部と基部のそれぞれの部位で、表皮・マニキュア・シリコンラバーの3種類の方法でレプリカ像をとり、気孔を観察した。

その結果、2-4-2のAのように環境条件によって自然に開かせた気孔に比べ、はるかに大きく開いた気孔が観察された。すなわち、孔辺細胞が膨張し、気孔が丸くなり大きく開いていた（図7）。葉の先端部と基部とで、気孔開閉の違いは特に見られず、いずれの部位でも気孔は大きく開いていた。

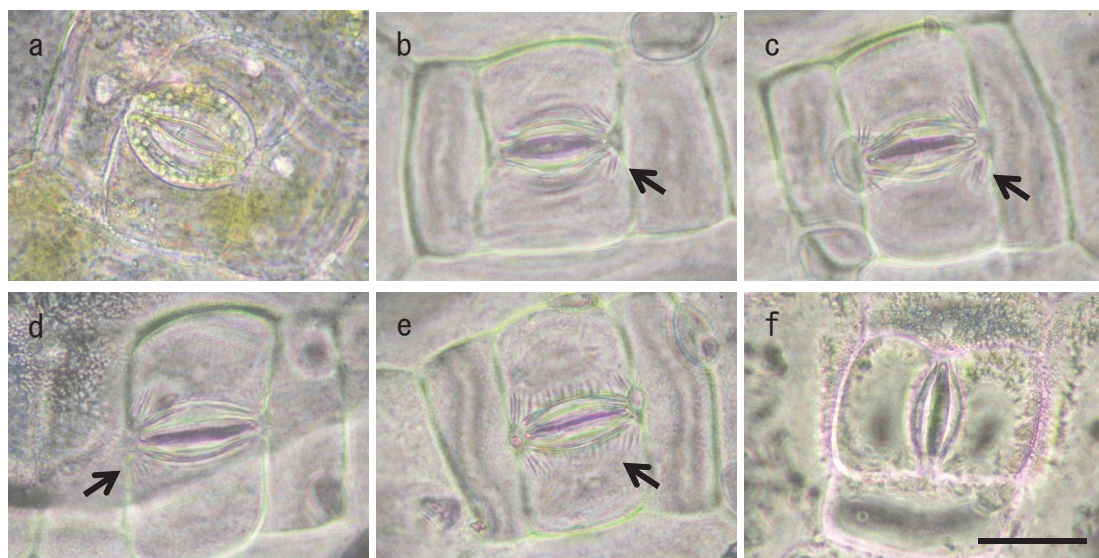


図6 開いている気孔の観察

a: 表皮の気孔、b,c: マニキュアを用いたレプリカ、d,e: 液体絆創膏を用いたレプリカ、f: シリコンラバーを用いたレプリカ。b~e には、筋やしわのような構造が見られる（矢印）。 bar: 50 μ m

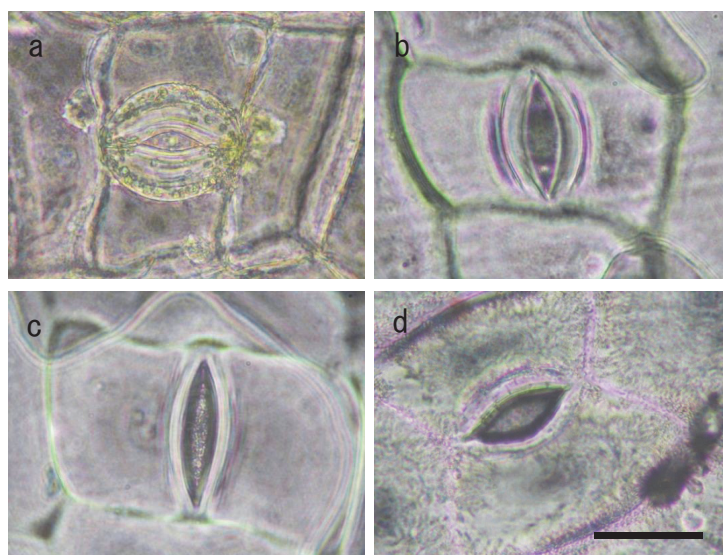


図7 フシコクシン処理で開いている気孔の観察

a: 表皮の気孔、b,c: マニキュアを用いたレプリカ、d: シリコンラバーを用いたレプリカ。 bar: 50 μ m

また、フシコクシン処理で開いた気孔をマニキュアで観察した場合、3-2-2で自然に開いた気孔を観察した際に見られた筋のようなものなどは、ほとんど見られなかった。

4. まとめ

本研究では、汎用されているレプリカ法について、生きた気孔の状態を正確に反映し、かつ簡便・鮮明に気孔が観察できるかどうかについて比較検討した。

その結果、マニキュア・液体絆創膏・シリコンラバーを用いた3種類のレプリカ法について、それぞれの間で、観察像の鮮明さや、気孔の開閉状況に顕著な違いは見られなかった。また、同時に葉の表皮を剥がして直接観察する方法で見られた気孔の観察像と比較しても、解像度や気孔の開口度に顕著な違いは見られなかった。

ただし、環境条件によって自然に開いた気孔の観察を行ったところ、マニキュア・液体絆創膏を用いた気孔のレプリカでは気孔の開口度がやや小さくなるものや、気孔の周辺に筋のような構造が見られるものがあった。それに対して、シリコンラバーを用いた気孔のレプリカでは、そうしたものはほとんど観察されなかった。

日本植物生理学会のHPでは、気孔の開閉状況を反映したレプリカ像を得るためにはシリコンラバーの使用を推奨している（日本植物生理学会HP）。その理由として、マニキュアなどを用いた場合、含まれる有機溶媒の影響で気孔が閉じてしまうと説明している。

今回の検討結果から、確かにシリコンラバーを用いる方法が気孔観察には好ましいことが示された。しかし一方で、マニキュアや液体絆創膏を用いたレプリカ法で、開いた気孔が閉じてしまうというほどの大きな影響は見られず、気孔の形状や開閉状態などの概要をつかむには、マニキュアなどのレプリカ法で十分であることも明らかになった。

前述したように、シリコンラバーは種類も多く、価格も高く、現実的には入手しにくい。そのため、

学校現場などでレプリカ法を用いる場合は、気孔の開閉状態などをどの程度正確に観察させる必要があるか、費用はどのくらいかけられるか、といったことを判断し、汎用されているマニキュアや液体絆創膏などを用いたレプリカ法を適宜活用していくことが望ましいと言えよう。

5. 謝辞

本研究を行うに当たり、シリコンラバー（デンタルラバー）の購入ならびに使用についてご教示くださった日本歯科大学生命歯学部生理学講座の佐伯周子准教授と井出良治助教、フシコクシンを提供して下さり、植物の気孔についてご教示くださった東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻植物全能性制御システム解析学分野の松垣匠特任助教に心からお礼を申し上げます。

注

1) 鈴木純一氏は、スンプ法を開発した当初は郡是（ゲンゼ）製絲株式會社の技師であったが、その後、大妻女子大学家政学部の教授となった。1932年に『スンプ「鈴木式万能顕微印画法」の発明』で朝日賞を受賞している。

6. 参考文献

- 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．日本作物学会紀事，61，159－160．
- 井上勤（監修）（1998）新版顕微鏡観察シリーズ2 植物の顕微鏡観察．地人書店，106－112．
- 石神順三（1932）鈴木しい萬能顯微印畫法の應用．醫科器械學雜誌，10（4），180－181．
- 木島正夫（1962）植物形態学の実験法．廣川書店，60－62．
- 日本植物生理学会ホームページ みんなのひろば 植物Q&A「開閉両方の気孔を観察するには」（登録番号1492）<http://www.jspp.org/>

- hiroba/ q_and_a/detail.html?id=1492 (2016年9月7日最終アクセス)
- Sampson, J. (1961) A Method of replicating dry or moist surfaces for examination by light microscopy. *Nature*, 191, 932 - 933.
- 静岡県総合教育センターホームページ 気孔観察—シマフムラサキツユクサを用いて, レプリカ法— <http://www.center.shizuoka-c.ed.jp/curri/cpc/Web/kannsatujiikennsyuu2/21B01b.pdf> (2016年9月7日最終アクセス)
- Squire, G.R. and Mansfield, T.A. (1972) Studies of the mechanism of action of fusicoccin, the fungal toxin that induces wilting, and its interaction with abscisic acid. *Planta*, 105, 71-78.
- 鈴木純一 (1930) 物体の表面を観察すべき透明薄膜又は薄版状顕微鏡標本の製作法. 特許第88353号 (1930年9月16日)
- 鈴木純一・羽室亨 (1955) 織物組織の顕微鏡写真作成法. 大妻女子大学紀要, 1, 17 - 29.
- 谷口光平・上田哲三 (1933) 鐵鋼の研究及び検査に對するスンプ法の應用. 鉄と鋼, 19 (10), 806-814.
- Turner, N.C. and Graniti, A. (1969) Fusicoccin: a fungal toxin that opens stomata. *Nature*, 223, 1070 - 1071.
- 臼井英夫・サンダ レエ ウイン (1997) 気孔を観察するための簡易レプリカ法. 三重大学教育学部研究紀要, 48, 自然科学, 23 - 28.
-

The Comparison of Replica-Methods to Observe Stomata

NATSUMI HOSOYA and MIYU SAITO

School of Social Information Studies, Otsuma Women's University

Abstract

The replica-methods (or SUMP-methods) are used as a simple and easy way to observe stomata of leaves. To make replicas, nail polish or liquid adhesive plaster is generally used.

In this study, we compared several replica-methods used generally focusing on the points if we could observe stomata conveniently and clearly by reflecting a living state. Here, we also used silicone rubber (dental rubber). Moreover, we observed isolated epidermal strips of leaves, as well.

There were not so significant differences in clarity and opening/closing state of stomata observed by replica-methods when using nail polish, liquid adhesive plaster, or silicone rubber.

We concluded that replica-methods using nail polish or liquid adhesive plaster are enough to clearly observe the shape or opening/closing state of stomata conveniently.

Key Words (キーワード)

Repulica-method (レプリカ法), SUMP-method (Suzuki's universal micro-printing method) (スンプ法), Stomata (気孔), Silicone rubber (シリコンラバー), Nail polish (マニキュア), Liquid adhesive plaster (液体絆創膏), Fusicoccin (フシコクシン)