

セントポーリアの低温傷害と リーフスポット（黄色斑）形成との関連

津田拓史*・新村洋一**・加藤哲也**

(平成14年8月20日受付/平成14年12月11日受理)

要約：クロロフィル蛍光を指標としてセントポーリア光合成系の低温傷害の初期過程を解析した。成葉を低温の水につけると光化学活性は一時的に失われるがやがて回復する。しかし、葉の一部だけを低温の水に10秒間ひたし、すぐにその境界部を含めてさらに葉の中央まで低温水にひたすと、最初の処理で低温水に接触しなかった部分に帯状の黒色のバンドが現われ、この部分では光化学活性が失われ、回復しない。光照射下ではこの部分はやがて黄色斑に移行するが、この部分以外では光合成活性が回復し正常葉の状態を回復した。低温傷害の可逆性を決めるのは低温に接触した時間や温度の低さではなく、葉面上の局所的な温度差であり、温度差が生じたとき温度の高い側の細胞が不安定化して、これが傷害のひきがねになっていると思われる。

キーワード：低温傷害、クロロフィル蛍光、リーフスポット、低温傷害の可逆性、セントポーリア

緒 言

セントポーリアはタンザニア原産の熱帯植物で、低温傷害を受けやすい植物の一つである。この植物の葉面に黄色斑 (leaf spot) が生じやすいことは古くから花卉園芸の世界ではよく知られ、葉温が30°Cのときは15°Cの水、葉温が20°Cのときは5°Cの水というように温度の低い水を灌水したときに発生することが明らかにされている¹⁻³⁾。これらの黄色斑はこの植物の光合成系が低温水によって損傷を受け、光合成色素の分解にいたるものであるが¹⁾、この植物の光合成系の低温傷害が常に黄色斑になるか否かは不明である。例えばこの植物にしばしば現われる環状黄色斑 (ring spot) は中央が緑色の黄色斑で、葉面に水滴をおとしたあとに現われるものであるが⁶⁾、水滴による温度低下で発生するとすれば中央部が緑色に残ることは説明できない。このような現象に注目すれば水滴による温度低下を直接黄色斑と結びつけるのには疑問があり、むしろここでの出来事を黄色斑にいたる傷害とそうでない可逆性のある傷害にわけて考えることが必要である。

セントポーリア葉の低温傷害の初期過程についてはいくつかの研究があり、低温にさらすことによって、あるいは短時間冷水に浸すことによってクロロフィル由来の蛍光が減少し、光合成系の諸活性が低下すること^{9,10,12)}、酸素吸収が増大すること^{2,10)}、葉緑体チラコイド膜の構造が変形すること^{11,12)}、電解質やアミノ酸様物質が溶離すること^{2,4)}などが明らかにされているが、これらが黄色斑形成につながる傷害を見ているのか、可逆性の損傷に伴う事象なのか、検討しなおすことが必要と思われる。本研究では低温処理

でおこる局所的な変化をクロロフィル蛍光を指標として追跡することを目的として計測系を組み立て、光合成系の傷害を再検討することを試みた。その結果、セントポーリア葉の光合成系の傷害には回復可能な部分と、黄色斑にいたる不可逆的な部分とが分けられること、低温が常に黄色斑にいたる傷害を引き起こすものでないことを示す知見を得ることができた。

材 料 と 方 法

実験材料はセントポーリア (*Saintpaulia ionantha*)、イズミ株で、ロイヤルグリーン株式会社 (岐阜県本巣郡) から入手した。株は実験に用いるまで13時間明 (36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 23°C) 11時間暗 (22°C) のインキュベーターに保存した。なお、この一連の実験は2002年6月から7月にかけて、室温22~25°Cの条件で行ったものである。

低温処理には葉数10~15枚程度の株から切り離した成熟葉の全部あるいはその先端側の一部を10°Cの水に10秒間浸し、水をふき取ってただちに暗箱に移し測定に供した。低温処理を2段階で行う場合は、はじめ先端側約1/3を10°Cの水に10秒間浸し、そのまま葉を中央部まで浸けて5秒後に水から出して、測定した。長時間にわたる変化を見るため、葉を株についたままで冷水につける実験も行ったが、株から切り離した葉の切り口に水を絶やさないように注意すれば本質的な違いはなかった。

クロロフィル由来の蛍光の測定には二股の光ファイバーストラスを用い、その一方から青色フィルター (コーニングガラス4-72) で620 nm以上をカットした光 (1.7 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) を葉の表面に導き、葉面から出る光を光ファイ

* 東京農業大学大学院農学研究科バイオサイエンス専攻

** 東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科

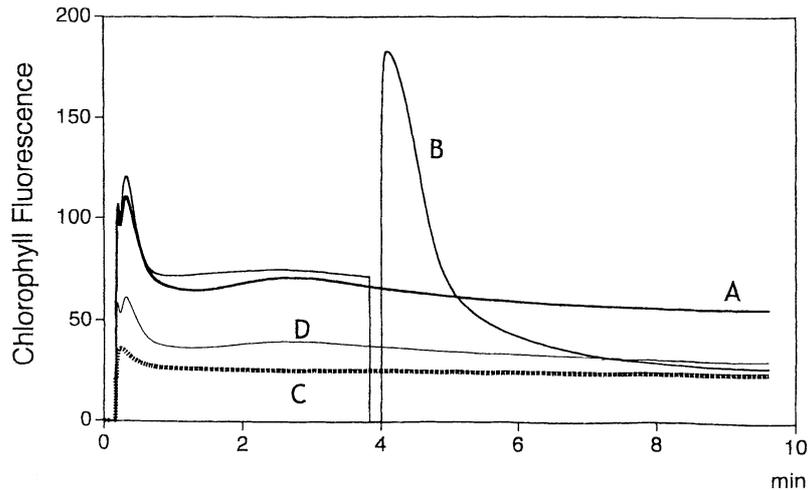


図1 セントポーリア成葉の蛍光強度の初期誘導変化。いずれも10分以上の暗期をおいて励起光(青色)を照射し、室温における蛍光強度を記録した。

- A: 正常な葉(水に浸していない)
 B: 3分48秒目に葉全体を10°Cの水に10秒間浸した
 C: 低温処理後1時間(室温)
 D: 低温処理後2日(切り口を水に浸し、室温に放置)

パーのもう一つの腕で拾い上げて、赤色フィルター(R64, 保谷ガラス)でクロロフィル蛍光だけを選別した後、ホトダイオード(S2281-1, 浜松ホトニクス)に導いた。この信号を増幅し、デジタル変換を行って記憶装置に読み込ませたが、この装置の取り込み速度は毎秒22データで、光照射開始直後の蛍光(F_0)を読み取るのは難しいが、誘導変化を観察するには充分であった。この装置で葉面上の局所的な変化を測定するときには、葉に接する側の光ファイバーの開口部の断面は1mm×2mmの矩形にした。光合成系蛍光の初期誘導(Kautsky effect)の測定では測定前に5分間の暗期をおいて測定値を安定化するようにした。

低温処理による葉面蛍光の局所的な差を見るためにカメラによる画像の追跡も行った。青色ポリカラーフィルター(#57)で覆った蛍光灯の光の下でカメラのレンズを赤色フィルターで覆い撮影した。

傷害をうけた葉のクロロフィルの蛍光誘導曲線およびカメラによる蛍光画像は主要な点については30回以上の、また経時変化を追跡する実験では10回以上の記録をとり、その中から代表的なものを選んで提示した。

結 果

(1) 低温処理による葉の変化とクロロフィル蛍光

図1は暗所においたセントポーリアの成葉に測定光をあてて葉面からの蛍光強度を記録したもので、照射開始直後に蛍光強度の大きな変化(Kautsky効果)を示したのち、蛍光強度は低下し、小さな上昇と下降をみせ、ゆっくりと低いレベルで定常化する(線A)。測定開始4分後に葉を10°Cの水に10秒間浸すと(以後、これを低温処理と呼ぶ)、蛍光強度が急激に上昇し10秒ぐらいで測定開始直後より高いピーク値に達し、それからすぐに急速に低下しやがて低温処理前のレベルより低いレベルに落ち着く(線

B)。低温処理をうけた葉と正常な葉の違いは後者では5分以上の暗期をおけば再び高い蛍光レベルとKautsky効果を繰り返すのに対し、低温処理を受けた葉では蛍光レベルは低いままで十分な暗期をおいてもKautsky効果はほとんど見られなくなっている点である(線C)。

しかし、低温処理によってKautsky効果を示さなくなった葉をそのまま室温に放置すると4~5時間後から少しずつKautsky効果を示すようになり、2日後にはKautsky効果の大きさも未処理のもの50%近くまで回復するのが認められた(線D)。

(2) 2段階の低温処理

セントポーリア成葉の先端部約1/3を(図2Aの破線の位置まで)10°Cの水に10秒間浸してから、さらにそのまま葉の2/3ぐらいの位置(図2Aの実線)まで5秒間浸けて水を拭き取ると、まもなく低温水に接した部分全体が暗緑色に変色しはじめた(図2B)。このとき葉面の蛍光を見ると低温処理部分が未処理部分より強くなり、同時に葉の中央に蛍光発光のない帯が現われるのが認められた(図3B)。これは最初の10秒の低温処理を受けていない領域で2回目の処理ではじめて低温に接した部分にあたる。その後1~2分以内にこの蛍光発光のない帯の位置に黒色の帯が現われ、それと平行して処理直後に現われた暗緑色の領域は小さくなっていった(図2C)。黒色帯は1時間位後には灰褐色に変わったが、その面積は小さくなるようなことはなく(図2D-E)、光照射下におくと黄褐色に変わっていった(図2F)。蛍光の低い領域の大きさもそのまま蛍光強度の回復も起こらなかった(図3B-C)。図4は葉面の蛍光の初期誘導(Kautsky効果)を見たもので、2段階処理で2回目に低温に接した領域で1回目の処理との境界に近く黒色に変色するはずの部位(C)は処理直後からほと

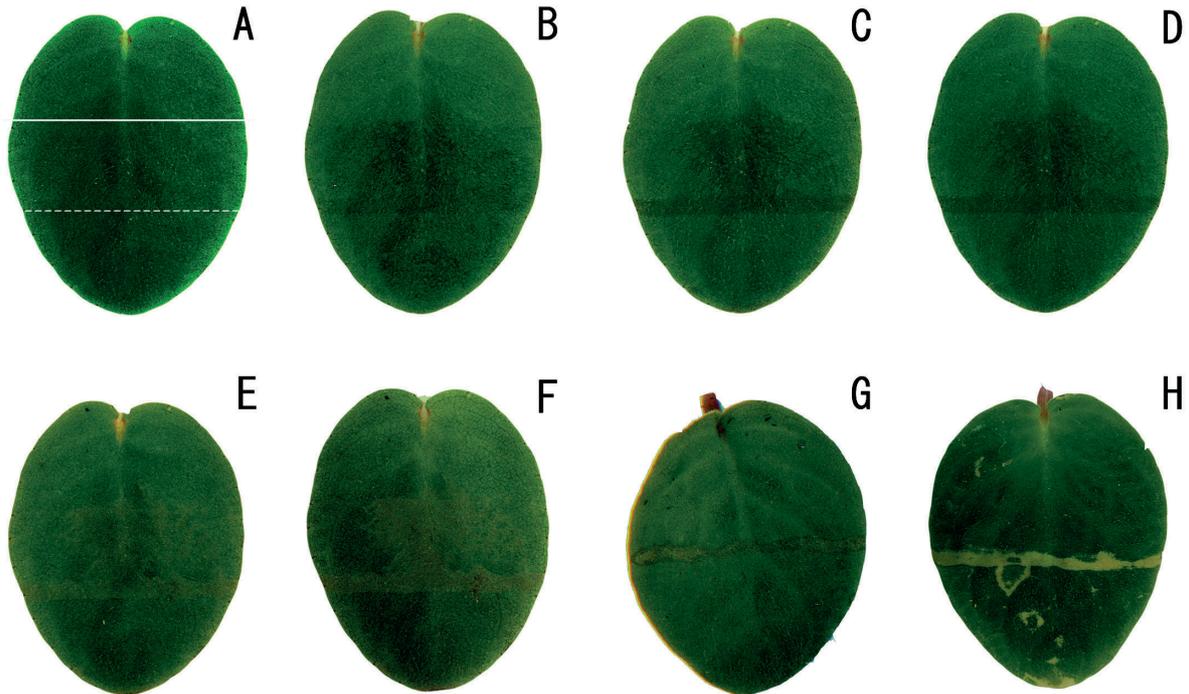


図 2 低温処理によるセントポーリアの葉色変化。まずセントポーリア成葉の先端側約 1/3 (図 A の破線) まで 10°C の水に 10 秒間浸し、そのまま葉を約 2/3 (図 A の実線) まで沈めて 5 秒おき、水を拭き取って撮影した。A-処理前; B-冷水から出して 30 秒後; C-10 分後; D-1 時間 (暗) 後; E-1 日 (暗) 後; F-3 日 (明) 後; G-7 日 (暗) 後; H-20 日 (明) 後。このうち A から F までは同じ葉で葉の切り口を水に浸し、室温に放置したもの、また、H は葉を母株から切りはなさずに同じ処理を行ない、鉢をインキュベーター (“材料と方法” 参照) 中に 20 日間放置したものである。

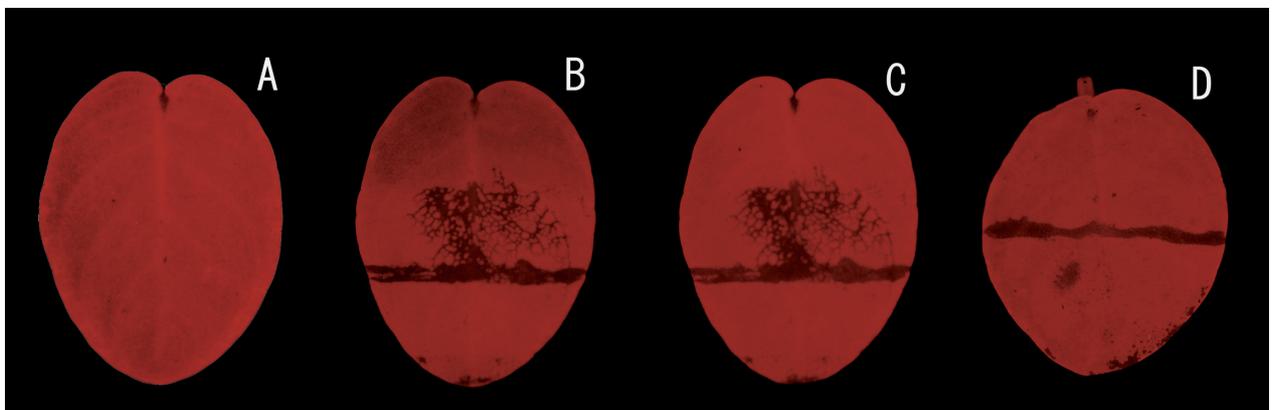


図 3 低温処理によるセントポーリア葉のクロロフィル蛍光発光像。2 段階の低温処理をした葉を青色光で励起し赤色フィルターを通して撮影した。A-処理前; B-低温処理 10 分後; C-1 日 (暗) 後; D-7 日 (暗) 後。このうち A から C までは図 2A-F と同じ葉で、D は図 2G と同じ葉である。

んど Kautsky 効果を示さなくなっている。それに対して、この部位より長く 10°C の水に浸されていた先端部 (D) や 2 回目に低温に接した領域で境界から離れていて黒色にならない部位 (B) では蛍光強度が低温処理直後に上昇し、それから一旦 Kautsky 効果は小さくなるものの、4 時間後にはほぼ正常な形を示すようになり、この部分では低温の影響が可逆的で限定的であることを示している。

黄色斑との関係を見る目的で株に付いたままの成葉で 2 段階の低温処理を行ない長時間の観察を行なうと、黒色の帯は光照射下では黄褐色になったあとで黄色帯に変わった (図 2H)。一方、2 段階処理をした葉は暗所では黄色斑への移行は起こらなかった (図 2G) が蛍光の低いバンドは消失せず (図 3D)、黄色斑の形成を抑制してもこの傷害を回復させることができないことを示している。

2段階の低温処理で傷害が不可逆なものになる理由は明らかでないが、10°Cの水に10秒浸しただけでは葉の変色はほとんど起こらず、また、蛍光の減衰もおおむね可逆的であった。しかし、葉の先端側約1/3を10°Cの水に10秒浸し、すぐ直角に倒して中央軸に平行に1/3を10°Cの水に5秒浸すと1回目の処理の境界線の外側に境界線に平行して2度目の処理を受けた部分だけに蛍光消失の帯が現われた(図5A)。その反対にはじめ中央軸に平行に1/3だけ低温で処理し、ついで中央軸に直角に1/3の位置まで処理を行った場合には中央軸に平行に最初の処理の境界の外側に蛍光消失の帯が現われた(図5B)。いずれの場合も光照射下に放置すると蛍光消失の帯がそのまま黄色斑に移行した(図5C, D)。これは黄色斑が1回目の処理によって決定され、それが傷害として発現するためには2回目の低温が必要であること示している。

最初に低温水に浸された境界の外側に傷害が発生するという現象は低温水の代わりに冷却したシリコンオイルを用いた場合にも見られたが、25°Cのインキュベーターで馴化した葉の場合には15°Cあるいはそれより高い温度の水では傷害の発生はまったく見られなかった(データ省略)。

(3) 黒色帯の吸収スペクトル

2段階の低温処理によって葉が黒色に見えるようになるかその原因は不明である。図6は黒色に変色した部分と処理の葉の吸収スペクトルを比較したもので、暗緑色の部分では530~580 nmの範囲で吸収が増加し、クロロフィル吸収帯の領域(440~520 nm, 640~680 nm)で減少している。変色部では720 nm以上の長波長の吸収が増加していることから、葉内部の光散乱が増したと思われるが、葉組織内の変化の実体は明らかにできなかった。

黒色帯部分のアセトン可溶性色素のHPLC分析パターンを正常な葉のそれと比較しても有意の差は認められず、また、抽出残渣の吸収スペクトルにも有意の差はなく(データ省略)、黒色への変化を有色物質の蓄積として説明するのは難しいように思われる。

考 察

(1) クロロフィル蛍光の減衰

暗所においた葉に光をあてると、クロロフィル蛍光は直後に高く上昇し、それから降下、上昇、降下を繰り返して

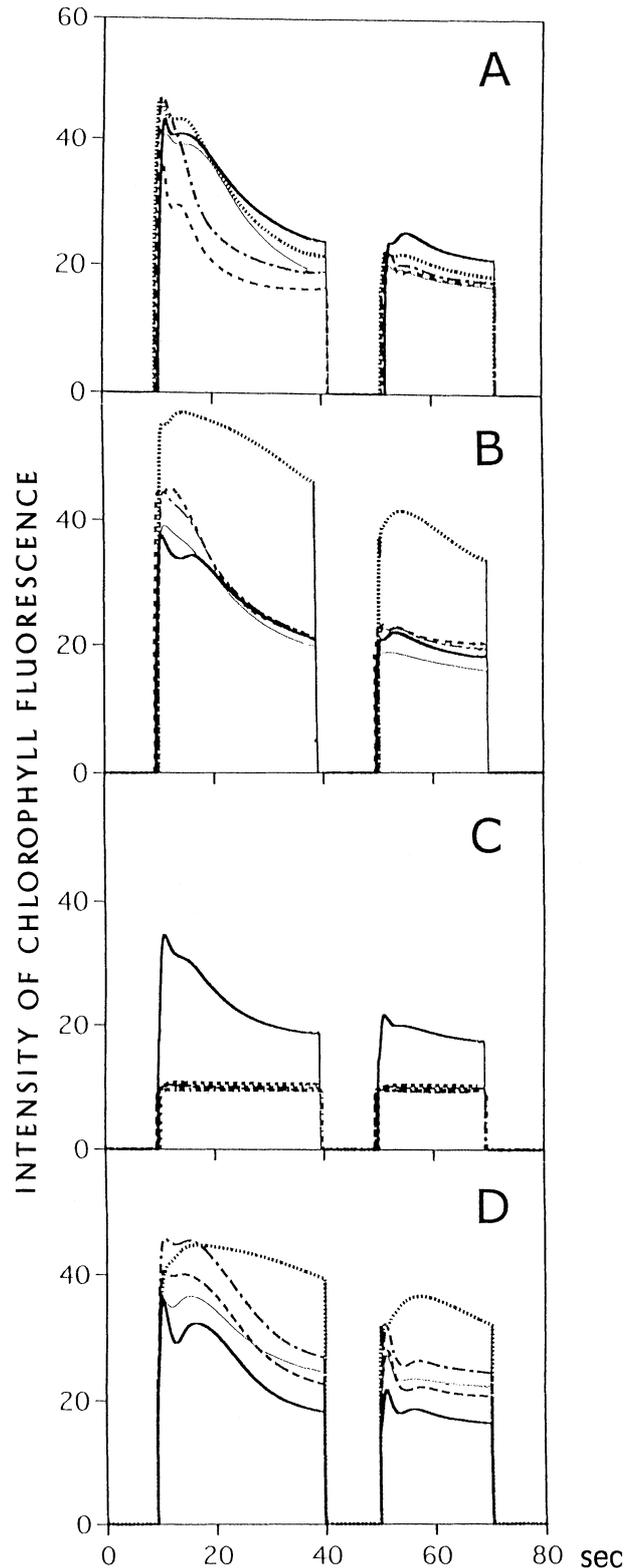


図4 2段階の低温処理を行なったセントポーリアの葉面クロロフィル蛍光発光のKautsky効果。実線(—)は低温処理前；点線(⋯)は低温処理1分後；破線(---)は10分後；一点破線(- - -)は1時間後；細線(—)は4時間後の測定で、測定と測定の間時間は暗所においた。測定開始10秒から30秒間青色励起光をあて、10秒の暗期をおいて再び20秒間励起光をあてた。Aは低温に触れなかった基部、Bは2段階処理の2回目ではじめて低温に接した領域のうち1回目の境界から遠い部位、Cは2段階処理の2回目ではじめて低温に接した領域のうち1回目の境界近く、黒色帯になるはずの部位、Dは葉の先端部。10°Cの水にさらされた時間はBとCが5秒、Dが15秒である。

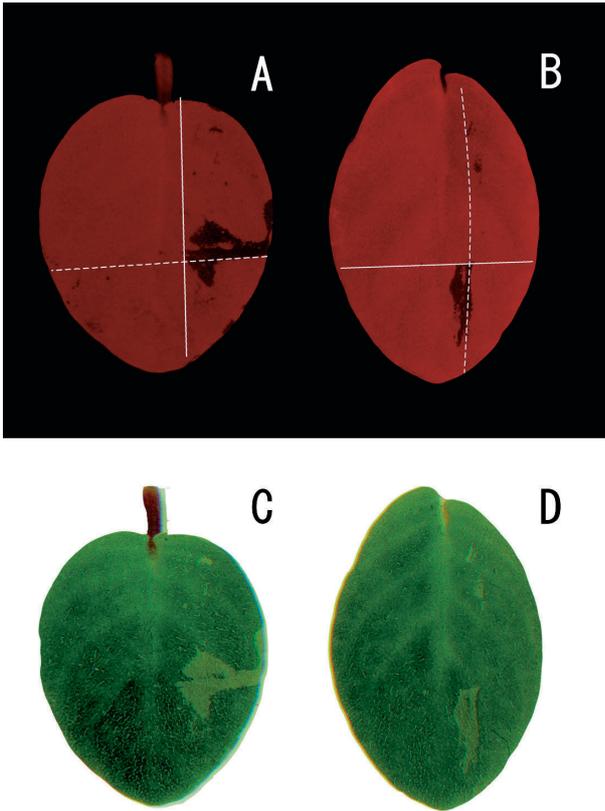


図 5 方向を変えて 2 段階の低温処理をしたときの傷害の現れ方。A, C: 葉の先端側を点線まで 10°C の水に 10 秒浸し、すぐ直角に倒して中央軸に平行に実線の右側を 10°C の水に 5 秒浸した。B, D: 中央軸に平行に点線の右側を 10°C の水に 10 秒浸し、すぐ直角に倒して中央軸に直角に実線の下側を 10°C の水に 5 秒浸した。A, B は処理後 10 分のクロロフィル蛍光像, C, D は 7 日間光照射下 ($1.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) においたもの

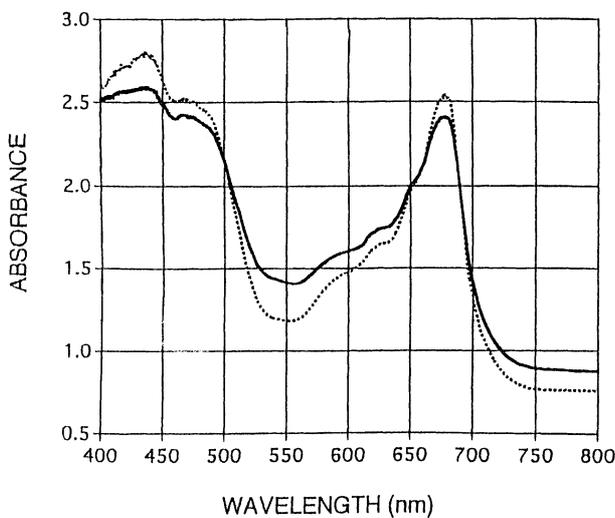


図 6 10°C の水に 10 秒浸して生じた直後の黒色帯の吸収スペクトル (実線) と処理前のスペクトル (破線)

常状態に達するが、この初期の誘導現象は Kautsky 効果とよばれる。チラコイド膜に電位がないときの蛍光強度は光化学系 II の電子受容体であるプラストキノン A (Q_A) の還元準位によって決まり、最初のピークは光化学系 II によるプラストキノン A (Q_A) の還元を、そしてその後の下降は光化学系 I へ電子が流れて Q_A が酸化されたことを反映している。このまま光照射を続けると正常なチラコイドでは膜電位形成にともなって非光化学的な消光が発生し蛍光は次第に小さくなる。すなわち、暗期を置くことは光照射によって発生した膜電位を解消させるのが目的で、その後、光照射によって生ずるクロロフィル蛍光の誘導現象は光化学系の電子移動の健全さの指標である。

定常状態に達したセントポーリアの葉を低温にさらすと、蛍光強度は急激に上昇して最初のピークより高いレベルに達するが、これは膜の透過性が損傷して膜電位が解消したことを反映している。これは低温処理後光合成系の遅延蛍光が急速 (8 秒以内) に消滅するという知見¹⁰⁾ や、チラコイド膜の配列が乱れる¹⁰⁻¹²⁾ という知見と符合する。しかし、膜電位の解消だけでは低温処理直後の蛍光レベルが照射開始直後のレベルより高くなる現象を説明できず、光化学系 I - II 間の電子伝達の停滞による Q_A の還元側へのシフトも同時に起こったものと考えられ、これは低温処理によって直ちに光合成の酸素発生反応が停止するという知見¹⁰⁾ をよく説明する。

このあと低温処理によって黒色に変色した部分 (図 4C) では蛍光強度は急速に低下し、平行して Kautsky 効果も小さくなって行くが、この状態では膜電位は失われ非光化学的消光は起こらないので、蛍光強度の低下は光化学系 II の失活が原因であると見ることができる。多くの低温感受性植物で酸素発生系の膜表面性蛋白が低温で離脱して光化学系 II の活性が低下することが報告されているが^{7,8)}、ここでも同様の傷害が起こったと考えられる。

しかし黒色に変色した領域を除けば、一度低下した電子の流れは程なく回復する (図 4)。それに対して黒色に変化した領域では蛍光収率の低下は回復せず、この部位では光化学活性の傷害が不可逆であることを示している。キュウリ葉では光化学系 II の低温傷害が可逆的であることが明らかにされているが⁷⁾、セントポーリアでは低温処理によって細胞小器官全体が大きく損傷を受けていて¹¹⁾、傷害の不可逆性は細胞の機能全体の損傷を反映しているのだろう。

セントポーリア葉の低温処理のあとに酸素吸収が大きくなるという報告があり^{2,10)}、酸化生成物が葉の黒色への変化の原因である可能性も考えられるが、変色した部分のアセトン抽出液にも残渣にも正常葉との差がなく、葉の組織の透過性や光学パスの変化という可能性の方が大きいと考えられる。

(2) 2 段階処理の意味

本研究で得られた成果のうち特に注目すべき点は、2 段階処理の実験で 10°C の水に 15 秒間ずっと浸されていた葉の先端部は室温に戻った後おおむね正常なレベルの光化学活性を回復したのに対して、2 段階処理の最初には低温に

接触しなかった領域では光合成活性が回復せず、黄色斑形成が最も顕著だったことである。これは不可逆的な傷害が低温処理の温度や時間によって決定されるのではなく、それとは別の生理学的要因によって決定されることを示している。我々はこの一連の研究の中で、この最初の処理で過敏化された境界領域の外側の細胞もその後20秒の間に低温にさらされなければ不可逆的な傷害にならず、正常な細胞活性を回復することを明らかにした (KATOH *et al.* in preparation)。これは、この植物の黄色斑の形成過程に二つの段階、すなわち、細胞が低温に過敏化される段階と過敏になった部位が低温刺激によって不可逆的な損傷に導かれる段階とが含まれることを示すものであり、ここで用いた2段階処理の手法は低温傷害の可逆的な過程を不可逆な傷害から区別して研究するのに有効な手段となることを示唆している。セントポーリア葉が低温水に浸されたとき葉温は4秒以内に平衡に達することが明らかにされており³⁾、それに対して水に浸されなかった境界近傍では、隣接する細胞間で温度勾配が持続しているはずで、この境界の外側だけが特異的に過敏化する現象を細胞間の温度勾配と関連づけて考えるのは必ずしも唐突とはいえない。

これに関連して興味深いのは前川ら³⁾の研究で、セントポーリアの葉温を急速に低下させたときには温度変化が一定の範囲より大きければ低温でなくても(たとえば40°Cから20°Cに下げた場合でも)黄色斑が発生することを明らかにしている。一方、PLIETHら⁵⁾はArabidopsisを低温で処理したとき細胞質に遊離されるカルシウムイオンの量が低温(T)そのものでなく温度低下の速度(dT/dt)に比例すること、そして温度低下に対応して増加したカルシウムは10秒程度で元のレベルに減衰することを見ているが、これらの知見は時間軸上の温度変化速度が絶対温度より生理学的に重要であることを示すもので、セントポーリア葉の傷害発生機構を考える上で有効な示唆となる。

セントポーリア葉を5°Cの水に浸すと浸された全領域で蛍光が低下し不可逆的な傷害になり¹⁰⁾、10°Cの水に浸した場合には境界部以外黄色斑にならないのは、温度差の限界を超えているか否かの問題として説明することができる。しかし、いずれの場合でも、葉温が低下した最初の段階には細胞の過敏化は起こっているはずである。従来のセントポーリアの低温傷害の研究でも多くの場合、葉の冷却される速度には留意せず、葉温が急速に降下する条件で行われ、過敏化のあとで回復する傷害と黄色斑にいたる不可逆的な傷害があることを意識せずに、後者だけに注意を注いできた。今後は研究の焦点をこの過敏化段階の実体の解明

におき、温度変化の速度に注意しながら傷害発生の様態を克明に観察する必要があるだろう。また、細胞質中の遊離カルシウムイオンの動態を測定する方法を工夫し、低温水に浸された細胞、浸されずにいる境界部の細胞について比較、検討することができればそれによって得られる成果は大きいと期待される。

参考文献

- 1) ELLIOT, F.H., 1946. Saintpaulia leaf spot and temperature differential. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 47, 511-514.
- 2) LARCHER, W. and BODNER, M., 1987. Criteria for chilling stress in Saintpaulia ionantha. *Angew. Botanik* 61, 309-323.
- 3) MAEKAWA, S., TORISU, Y., INAGAKI, N. and TERABUN, M., 1987. Leaf injury caused by drop in leaf temperature of Saintpaulia ionantha. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 55, 484-489.
- 4) MAEKAWA, S., TORISU, Y., INAGAKI, N. and TERABUN, M., 1990. Relation between development of leaf spot and electrolyte leakage of Saintpaulia ionantha. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 58, 985-991.
- 5) PLIETH, C., HANSEN, U.-P., KNIGHT, H. and KNIGHT, M.R., 1999. Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *The Plant Journal* 18, 491-497.
- 6) POESCH, G.H., 1942. Ring spot on Saintpaulia. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 41, 381-382.
- 7) SHEN, J.R., TERASHIMA, I. and KATOH, S., 1990. Cause for dark, chilling-induced inactivation of photosynthetic oxygen-evolving system in cucumber leaves. *Plant Physiol.* 93, 1354-1357.
- 8) SONOIKE, K., 1998. Various aspects of inhibition of photosynthesis under light/chilling stress: "photoinhibition at chilling temperatures" versus "chilling damage in the light" *J. Plant Res.* 111, 121-129.
- 9) YUN, J.G., HAYASHI, T., YAZAWA, S., YASUDA, S. and KATOH, T., 1995. Degradation of photosynthetic activity induced by abrupt temperature drop of Saintpaulia leaf. *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol. 4, Kluwer, The Netherlands, pp. 905-908.
- 10) YUN, J.G., HAYASHI, T., YAZAWA, S., YASUDA, S. and KATOH, T., 1997. Degradation of photosynthetic activity of Saintpaulia leaf by sudden temperature drop. *Plant Sci.*, 127, 25-38.
- 11) YUN, J.G., HAYASHI, T., YAZAWA, S., KATOH, T. and YASUDA, Y., 1996. Acute morphological changes of palisade cells of Saintpaulia leaves induced by a rapid temperature drop. *J. Plant Res.* 109, 339-342.
- 12) YUN, J.G., HAYASHI, T., YAZAWA, S., KATOH, T. and YASUDA, Y., 1997. Abrupt and irreversible reduction of chlorophyll fluorescence associated with leaf spot in Saintpaulia. *Scientia Horti* 72, 157-169.

Chill Injury in *Saintpaulia* Leaf with Special Reference to Leaf Spot Formation

By

Hiroshi TSUDA*, Yoichi NIIMURA** and Tetzuya KATOH**

(Received August 20, 2002/Accepted December 11, 2002)

Summary : Early events of cold injury of *Saintpaulia ionantha* leaf were investigated using the chlorophyll fluorescence as index. On exposure to cold water, the fluorescence induction kinetics (Kautsky effect) of the leaf declined and then recovered gradually. However, if a part of the leaf was dipped in cold water and then dipped deeper beyond the initial border, the bordering area outside of the initially dipped part turned dark and the chlorophyll fluorescence of this part was lost completely and irreversibly, indicating that the effect of coldness on this plant is twofold, reversible and irreversible. The darkened part turns to leaf spot if kept in the light for several days. The fate to irreversible injury does not depend on the extent of coldness or chilled period to which leaf was exposed but the temperature gradient at the boundary between the chilled and unchilled area seems to be crucial in the formation of leaf spot.

Key Words : Cold injury, Chlorophyll fluorescence, Leaf spot, Reversibility of chill injury, *Saintpaulia ionantha*

* Department of Bioscience, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Bioscience, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture