

園芸作物の栽培でこれまで見過ごされてきた急激な葉温降下のストレス
— その生理障害の重要性と発生機構の解明
(研究課題番号 12460015)

平成12～14年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))
研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 林 孝洋
京都大学大学院農学研究科・助教授

京都大学図書



9810056715

附属図書館

園芸作物の栽培でこれまで見過ごされてきた急激な葉温降下の
ストレスー その生理障害の重要性と発生機構の解明

(研究課題番号 12460015)

平成 12～14 年度科学研究費補助金 基盤研究(B)(2)
研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 林 孝洋
(京都大学大学院農学研究科・助教授)

研究組織

研究代表者	林 孝洋	(京都大学大学院農学研究科・助教授)
研究分担者	細川宗孝	(京都大学大学院農学研究科・助手)
研究協力者	梁 修静	(京都大学大学院農学研究科・博士課程3回生)

研究経費

平成12年度	7,900	千円
平成13年度	3,800	千円
平成14年度	2,300	千円
計	14,000	千円

研究発表

- (1) 梁 修静・林 孝洋・矢澤 進. 赤外線熱画像解析から見たセントポーリアの葉温降下とリーフスポットの発生程度. 園芸学会雑誌 69 (別1) : 342. 2000.
- (2) 梁 修静・林 孝洋・矢澤 進. イワタバコ科およびキツネノマゴ科植物で見られる有傷部から離れた葉の健全部に生じる褐変. 園芸学会雑誌 69 (別2) : 222. 2000.
- (3) Jae Gill Yun, SooJung Yang, Takahiro Hayashi and Susumu Yazawa. Leaf injury induced by temperature drop shock in Acanthaceae and Gesneriaceae plants. Korean Journal of Horticultural Science & Technology. 19 : 153-158. 2001.
- (4) SooJung Yang, Munetaka Hosokawa, Takahiro Hayashi and Susumu Yazawa. Leaf browning induced at sites distant from wounds in Acanthaceae and Gesneriaceae plants. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 71 : 535-537. 2002.
- (5) SooJung Yang, Munetaka Hosokawa, Takahiro Hayashi and Susumu Yazawa. Wounding enhances rapid-browning responsiveness of distal unwounded leaves to water stimulus in *Ruellia macrantha*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 72 : 286-291. 2003.

- (6) 梁 修静・林 孝洋・細川宗孝・矢澤 進. 赤外線画像解析から見たセントポリアの葉温降下と葉の褐変障害の発生程度. 生物環境調節 (印刷中) .

目 次

はじめに.....	1
第1章 セントポーリアのリーフスポット発生とその後の生育について.....	4
第2章 キツネノマゴ科およびイワタバコ科植物でみられる有傷部から離れた 葉の健全部に生じる褐変現象.....	11
第3章 赤外線画像解析から見たセントポーリアの葉温降下と 葉の褐変障害の発生程度.....	23
第4章 物理刺激によって誘導される植物の興奮状態の検討.....	37
第5章 傷つけ処理がつくり出す褐変に対する 過敏な状態（興奮状態）の生理的な特徴.....	45
第6章 興奮状態の誘導機構と健全部で見られる細胞死の 組織学および生理学的な検討.....	50

はじめに

セントポーリアに葉面かん水すると黄色斑状の障害（リーフスポット）が発生することは 50 年以上前から知られていたが(Poesch, 1942), この現象はイワタバコ科のごく限られた植物に起こる特異的なものと考えられ, 今日まで園芸的にあまり重要視されることはなかった. 障害発生の原因は葉温が急激に降下することであり (Elliot, 1946; 前川ら, 1987), 障害により葉組織から電解質の漏出が起こることが分かっているが (前川ら, 1990), 発生の詳しいメカニズムは調べられて来なかった.

リーフスポットの障害は, 葉温とは無関係に, 葉温が相対的に 8℃以上急激に降下したときに発生する. たとえば, 葉温が 35℃から 25℃に急降下すれば, 低下後の葉温が生育適温の 25℃であっても障害は発生する. 葉温の 10℃程度の急降下は, 温室栽培の植物では, 葉面かん水により日常茶飯に起こっている. もし, 急激な葉温降下のストレスがセントポーリアに限らず広く一般の植物にも起こっており, われわれがこれを認知していないだけであるとすれば, 栽培上重大な問題といえる. セントポーリアは葉温降下のストレスに敏感で黄色斑状の障害を発生するが, 顕著な障害を発生しないまでも, 強いストレスを受ける植物があることは十分予想できる. 多くの園芸植物を収集している京都府立植物園にて黄色斑状の障害を調査したところ, イワタバコ科だけでなくキツネノマゴ科のいくつかの植物に類似の反応が起こることが判明した. さらに, 最近の観察でシソ科やキク科の植物にも類似の反応ではないかと考えられる症例が観察された.

いっぽう、障害発生のメカニズムを解明すべく、葉温降下処理直後の葉の生理的、形態的变化を観察したところ、処理後数秒で柵状細胞が破壊され、その破壊には活性酸素が関与している可能性が強く示唆された。障害発生の様相から、申請者らは、急激な葉温降下ストレスがオキシダティブバースト（植物の病原菌感染抵抗性のシグナル伝達経路の初期過程で、NADPH オキシダーゼの活性を介して活性酸素種の一過的な産出が起こる現象）を引き起こし、細胞を過敏感反応死させるのではないかと考えている。

そこで、本研究では2つの視点からこの黄色斑状の障害を検討することにした。一つは、葉温降下ストレスが植物の生育に及ぼす影響を調べるもので、園芸生産上きわめて重要な意味をもつ。すなわち、急激な葉温降下を環境ストレスとして認知し、葉面かん水の是非を含め植物体温の調節の重要性を指摘するもので、国内外の園芸の研究でも類例がない。目に見えた障害が出なくても、葉温降下ストレスが植物の生育にマイナスに働くことが明らかになれば、栽培管理のための重要な知見が得られると考えられる。もう一つは、葉温降下ストレスがオキシダティブバーストの引き金になることを指摘するもので、植物生理学的に大きな意義をもつ。すなわち、植物の感染抵抗性のメカニズムとして近年非常に注目されているオキシダティブバーストについて、葉温降下ストレスもその引き金になることを指摘するもので、仮説通りの成果が得られれば植物生理学の分野でかなりの反響があるものと思われる。

研究期間中、具体的には(1)障害発生個体の生産性の検定、(2)障害

発生植物の検索，(3)発生防止法の検討，(4)過敏感細胞死との関連からの発生メカニズムの解明を試みた．急激な葉温降下のストレスを解明するのが本研究の目的であったが，その核心に迫るにはどうしても外部刺激に対する“過敏感反応”を明らかにする必要があった．したがって，結果的に実験の多くが，以下に解説される“興奮状態”の解明に費やされた．また，科学研究費申請時には，形質転換植物の作出（活性酸素消去酵素の遺伝子導入）も検討項目の1つであったが，3年という研究期間内では十分な成果が得られなかった．この点については，今後も研究を続けてゆきたい．

最後に，本研究を遂行するに当たっては，蔬菜花卉園芸学研究室の矢澤 進教授に数々の助言を賜った．また，本研究室の博士課程3回生梁修静君には，研究協力者として，実験の企画・遂行に多大な助力をお願いした．同君の緻密な観察と精力的な実験なくしては本研究は成立しなかった．記して厚く感謝の意を表する．

平成 15 年 3 月

林 孝洋・細川宗孝

第1章 セントポーリアのリーフスポット発生とその後の生育について

植物によっては外部温度の急激な変化に対して目に見える障害を現すものが存在する。リーフスポットはその代表例である。急激な葉温降下 (TDS; temperature drop shock) についてはある程度の TDS を受けた際に障害が現れ、柵上細胞の死で一端障害は止まるが、TDS の程度が大きい場合には柵上以下の細胞、海面上細胞、表皮細胞順に壊死が見られる。セントポーリアの葉は低温障害 (全組織枯死) にいたる間にリーフスポット様の組織一部の死 (柵上細胞) を経由することから、一瞬の TDS によって現れるリーフスポットとある程度の時間を必要とする低温障害とは関わりがあるものと思われる。また、植物によっては TDS によって障害は現れないものの、生育が遅延されるものも存在し、植物の温度変化に対する反応は興味深い。リーフスポットに関するメカニズムはいまだ十分解明されておらず、発生段階に関する知見も必要と思われる。リーフスポットを生じる植物は共通的に、障害発生後長い時間をかけて壊死した柵上細胞直上の表皮細胞が垂層分裂されることが観察される。TDS によるリーフスポットは外部環境変化に対する植物の防御反応かもしれない。葉温の変化がどのようにリーフスポットの発生までいたるのか、発生後の生育はどうなるのかについて調べた。

I. 赤外線熱画像解析から見たセントポーリアの葉温降下とリーフスポットの発生程度

リーフスポットの障害面積は、低下した葉温較差に比例して大きくなる。しかし、なぜ葉温格差に障害面積が比例するのか、またかん水を行う時に葉の表面温度がどのように変化し、障害発生までいたるのかについてはよく分かっていない。そこで、赤外線熱画像 (サーモグラフィ) 解析を用い、セントポーリアの水により変化する葉表面温度を調べることで、葉温変化と障害程度との関係について検討した。

【材料および方法】

セントポーリア 'Ritali' の葉齢の揃った成葉を実験に供試した。葉温変化 (処理前の平均葉温 - 処理直後の平均葉温) はサーモグラフィにより、障害程度 (障害面積/処理した葉面積 $\times 100$) は処理数日後の障害葉を画像解析することにより求めた。

葉温降下時間による影響：5℃の水に1～50秒間葉を浸水処理，または葉面から5cmの距離で2.4ml/l回噴霧のハンドスプレーを用いスプレー処理 **葉温による影響**：葉温が異なる葉（30℃と23℃）を用意し，葉を浸水処理，または2秒間12ml水をスプレー処理 **葉の被覆による影響**：表側をワセリンで被覆した葉と被覆してない同じ葉温の葉をそれぞれ用意し，葉を浸水処理 **水滴の大きさによる影響**：マイクロピペットにより水滴10～100 μ lを葉面直上から滴下した後の葉温変化と水滴1～20 μ lを滴下した後の障害程度（障害面積/水滴底面積 \times 100）を実体蛍光顕微鏡下で水滴付着1分後の蛍光強度低下の画像から求めた。以上の実験は室温23℃に設定した実験室で行った。

【結果および考察】

葉温降下時間による影響：葉温は，浸水後5秒（s）から10sの間に水温に近い温度まで変化した（第1図a）。浸水処理時間が長くなっても障害程度は葉温が水温まで変化した後には一定値を示し，障害発生はそれ以上進まなかった（第1図b）。葉温が水の温度まで変化している間では，葉温較差が大きいつれて障害程度が大きくなった。スプレー処理は葉の浸水処理より緩やかな葉温変化をしめし（第2図），5℃の水の50回連続スプレー処理によっても障害を生じなかった。

葉温降下速度：室温に置いた葉を異なる水温に3s間浸水処理した結果，単位時間当たりの葉温較差（葉温降下速度）が約3℃/sを超えたところで障害発生が見られ，この閾値を超えない場合には障害発生が見られなかった（第3図a）。リーフスポット発生に耐性を示す品種‘Maui’を用いて調べた結果，2～3℃/sを越えたところでリーフスポットの発生が見え始めるものの，発生程度は‘Ritali’より低かった（第3図b）。‘Maui’は‘Ritali’のような一定の閾値は見られなかったが，葉温降下速度が大きくてもリーフスポットが発生しにくく，高い抗酸化能力による生理的な違いによりリーフスポット耐性を示すものと考えられた。

葉温による影響：温度が異なる葉の表面に同じ温度の水がふれた時には，高い葉温の方で葉温降下速度が速かった。23℃の葉は，30℃の葉に比べ葉温変化が大きかった葉温降下処理（23 \rightarrow 13，30 \rightarrow 21）によっても，葉温降下速度が緩やかであったため，障害発生はほとんど見られなかった（第1表）。また，35，25，15℃の葉を用意し，それぞれ15℃差の葉温降下（20，10，0℃の水に3秒間浸水処理）を行った結果，葉温降下速度は35℃ $>$ 25℃ $>$ 15℃葉の

順に高く、障害程度も多かった（データ省略）。

葉の被覆による影響：葉表面を被覆する処理では、葉温降下速度が低下し、被覆してない葉に比べ、障害程度が少なかった（第2表）。閾値を超えた処理区では葉温較差が大きいほど障害程度は大きかった。よって、葉温較差が大きくても葉温が緩く低下する場合には障害発生が抑制された。

水滴の大きさによる影響：葉温降下速度は水滴が占める葉底面積（水滴量に比例）が大きいほど速くなり（第4図a）、水滴が占める底面積当たりの障害面積も大きかった（第4図b）。同じ水温の水であっても水滴が細かいほど葉温の降下速度は緩やかであるため、ミストや噴霧によるかん水はリーフスポットの発生を抑制するのに役立つと考えられた。

（まとめ）葉温の変化はその時の葉温と水温によって決まり、葉温降下速度が一定値を越えたところでリーフスポットが発生し始めた。また、葉温降下速度を緩く、閾値を超えない条件下では葉温較差が大きく変化しても障害発生が抑制されることが示唆された。

II. リーフスポット発生が植物の生育におよぼす影響

リーフスポットは柵上細胞が越しする障害であるため、障害を出した葉・株の光合成速度は低下するものと考えられる。実際リーフスポットの発生後に生育がどれほど遅延されるのかを調査した。

【材料および方法】

‘Ritali’を供試した。実験の間遮光したガラスハウスで栽培した。

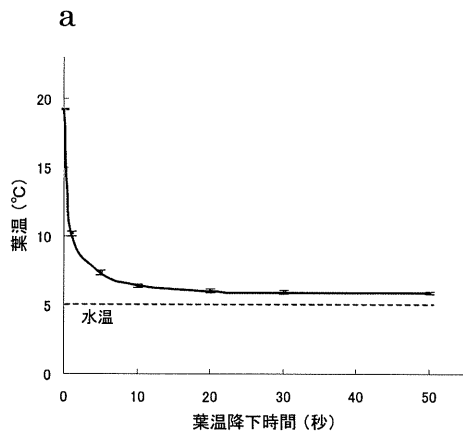
- ①リーフスポット発生株の生育速度；7℃の冷水を頭上かん水しリーフスポットを植物全体的に発生させた株を用意し、健全株との間で生育速度（展開葉数測定）を調べた。
- ②リーフスポット発生葉の生育速度；10~11℃の冷水に葉を浸水処理することでリーフスポットを発生させた（12枚平均11%リーフスポット発生）葉と健全葉との間で生育速度を調べた。
- ③リーフスポット葉の葉ざしによるシュートの生産量；リーフスポットを発生した葉（平均31%リーフスポット発生葉、平均13%リーフスポット発生葉）を用意し、それぞれ葉ざし80日、100日後にシュートの数、新鮮重、乾物重を調査した。

【結果および考察】

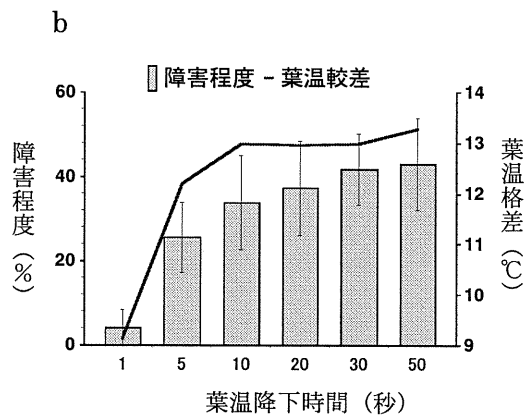
①②リーフスポットが発生した株の生育速度、個葉の身長程度は、健全な植物に比べ差が見られなかった（第5図、第6図）。前回のデータで、健全葉とリーフスポット発生30~70%葉との間で葉の身長程度に差が見られなかった結果と一致した。障害面積が30%以下の場合、リーフスポットの障害面積と葉の身長程度には相関が見られなかった（第7図）。

③リーフスポットを多く発生した葉（12~72%発生）と若干発生した葉（5~24%発生）の葉ざしからのシュートの生産量を調査した結果、両区ともリーフスポット発生葉と健全葉の間に大きな差は見られなかった（第3表）。ただし、リーフスポットを多く発生した葉では、障害面積とシュートの生産量（シュート数、シュートの新鮮重・乾物重）との間に相関が見られ、障害面積が50%以上をしめる葉においては50%以下の葉に比べ少しシュートの生産量が低下していた（データ省略）。

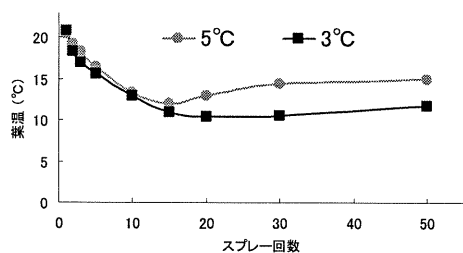
以上のことから、リーフスポットの発生は直接株の生育速度に大きな影響をおよぼさないことが示唆された。リーフスポットが発生した葉からのシュートの生産には、障害面積が50%以下をしめる葉についてはシュートの生産量に健全葉と差がないことが示唆された。



第1図 a. 葉温降下時間による葉温の変化
葉 5~6 枚の平均±SE



b. 葉温降下時間による障害程度



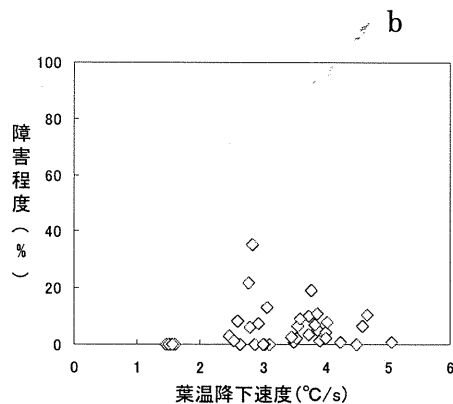
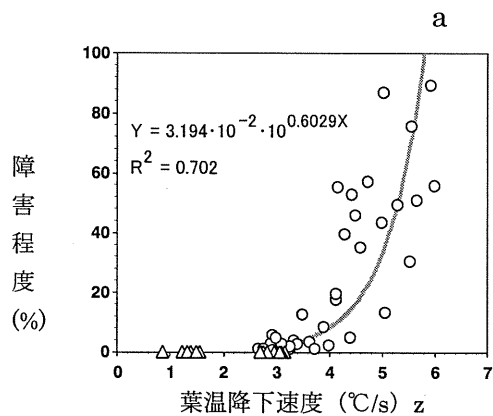
第2図 スプレー回数による葉温変化

第1表 葉温の違いが葉温変化に及ぼす影響

	葉温(°C)		障害程度(%)
	処理前	浸し処理後	
葉温30°C	29.9±0.2	13.3±0.4 (5.5)x	56.4
葉温23°C	23.2±0.3	13.2±0.3 (3.4)	3.8
	処理前	スプレー処理後	
葉温30°C	30.2±0.4	21.4±0.6 (4.5)	26.1
葉温23°C	22.7±0.4	18.6±0.3 (2.1)	2.5

z 10°C水に3秒間処理 y. 5°C水を2秒間5回連続スプレー処理
x 葉温降下速度

葉 8 枚の平均±SE



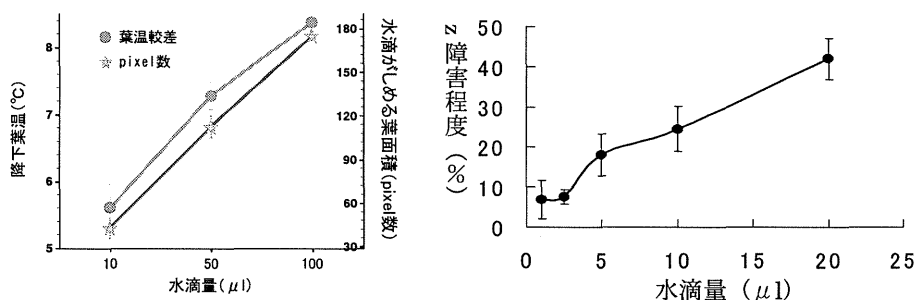
第3図 葉温降下速度と障害程度
z: 15,10,7,5°Cの水に葉を3秒間浸水処理することにより低下した葉温変化を1秒間の葉温変化に換算

a: 'Ritali'
b: 'Maui'

第2表 葉の被服による葉温降下程度および障害程度

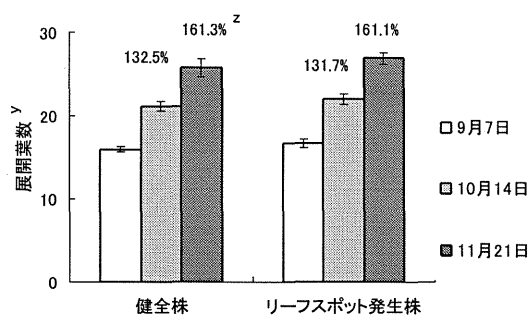
	被覆区		対照区	
	3秒間7C処理	1秒間5C処理	3秒間7C処理	1秒間5C処理
葉温較差(°C)	8.8±1.8	7.6±5.3	13.1±3.6	11.5±4.8
葉温降下速度(°C/s)	2.9±0.1	7.6±5.3	4.4±0.1	11.5±4.8
障害程度(%)	1.4±0.5	7.0±2.9	41.9±4.7	32.6±5.9

葉 10 枚の平均±SE



第4図 a 水滴量による葉温降下程度
葉 8 枚の平均±SE

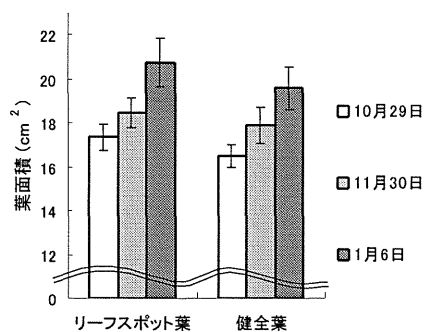
b 水滴量と障害程度との関係
葉 8~10 枚の平均±SE
z:水滴の底面積当たりの障害面積(水滴
付着 1 分後の蛍光強度が低下した
面積を障害面積とした)



第5図 リーフスポット発生株と健全株の生育速度(展開葉数)

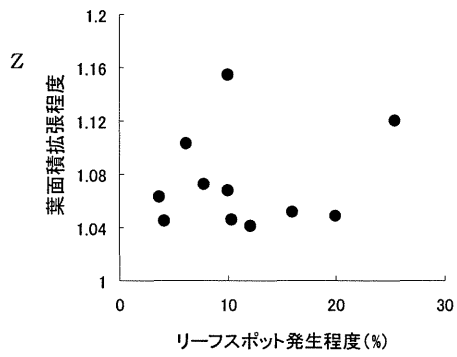
それぞれ10株の平均±SE

z:葉の展開速度、y:葉身長0.5cm以上の葉から数えた



第6図 リーフスポット発生葉と健全葉の生育程度(葉面積)

'Ritali' 9株から, それぞれ 12 枚(リーフ
スポット発生葉), 11 枚(健全葉)の平均±
SE



第7図 リーフスポットの障害面積と葉面積拡張程度との関係

z: 測定終了時の葉面積/測定はじめの葉面積

第3表 リーフスポットの発生葉からの葉ざしがシュートの生産量におよぼす影響

	リーフスポット発生程度 (%)	葉ざし葉の新鮮重 (g)	シュート数	シュートの新鮮重 (g)	シュートの乾物重 (mg)
リーフスポット発生葉	31±3.4	5.5±0.2	8.6±0.4	2.4±0.3	67.4±6.4
健全葉	0	5.9±0.2	9.9±0.5	2.7±0.3	76.8±6.1

葉ざし 80 日後の調査結果

	リーフスポット発生程度 (%)	葉ざし葉の新鮮重 (g)	シュート数	シュートの新鮮重 (g)	シュートの乾物重 (mg)
リーフスポット発生葉	13.4±1.9	5.1±0.17	7.7±0.6	3.3±0.4	84.6±9.2
健全葉	0	6.4±0.3	7.5±0.5	4.7±0.6	121.2±12.3

葉ざし 100 日後の調査結果

第2章 キツネノマゴ科およびイワタバコ科植物でみられる有傷部から離れた葉
の健全部に生じる褐変現象

**Leaf Browning Induced at Sites Distant from Wounds in Acanthaceae and
Gesneriaceae Plants**

Soo Jung Yang*, Munetaka Hosokawa, Takahiro Hayashi and Susumu Yazawa

Laboratory of Vegetable and Ornamental Horticulture, Department of Agronomy and Horticultural

Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502

Received; August 20, 2001. Accepted; November 26, 2001.

*Corresponding author.

Summary

Leaf browning was induced at sites distant from the wounds in detached leaves in 6 species of Acanthaceae and 13 species of Gesneriaceae plants. This injury was observed in unwounded young leaves after their detachment from the mother plant, and sometimes in unwounded leaves on the wounded plant, e.g., when stem cuttings were made. The injury is restricted to one layer of palisade cells; the response is rapid. Chlorophyll fluorescence intensity decreased irreversibly in an injured tissue within seconds at sites distant from the wound.

Key Words: Acanthaceae, Gesneriaceae, systemic leaf injury, wounding.

Introduction

We found that several species in the Acanthaceae and Gesneriaceae respond to removal of basal leaves or detaching shoots from the mother plant by obvious browning in the upper unwounded leaves. It is a rapid response as green leaves become brownish within a few seconds after the wounding. Finally, the color of the injured portion remains brownish-yellow. In *Ruellia macrantha*, a wound-sensitive plant, young leaves as far away as 70 cm from the cut end of the shoot showed signs of injury. To date, there have been no reports about this phenomenon.

Several species of Acanthaceae and Gesneriaceae are popular and valuable not only as flowers but also as foliage plants. These plants are usually propagated by using leaf cuttings or stem cuttings (Virginie and Elbert, 1976). Although these procedures entail wounding that causes leaf injury, this phenomenon has been overlooked until now. In this study, we examined the systemic response to wound in many species of Acanthaceae and Gesneriaceae.

Materials and Methods

Fifteen species of Acanthaceae and fourteen species of Gesneriaceae plants (Table 1) were grown from cuttings for at least one year in a glasshouse with 90% shading under a natural photoperiod at 18 to 35°C by day and 15 to 20°C by night.

The plants were subjected to one or two of the following wounding treatments: a leaf or shoot was detached from the mother plant by hand or crushed with a leaf punch (0.5 cm in diam) 1 or 2 minutes after detachment. Plants in which browning appeared on unwounded

leaves and those in which injuries appeared at sites distant from the wounds in the detached leaves were classified as injured plants. Other organs were also examined for signs of injury. Wound treatments were conducted in a glasshouse on sunny days from May to July, 2000 and the injuries were detected by the naked eye and ascertained under a fluorescence microscope.

Chlorophyll fluorescence is the most sensitive and rapid indicator to determine whether leaf injury occurred or not at that stage in *Saintpaulia* (Yun et al., 1998). Injury, induced at a site distant from the wound, was detected by fluorescence microscope, using symptomless detached leaves. The adaxial side of the leaf was viewed under a fluorescence microscope (MZ FL III, Leica, Switzerland), equipped with an exciter (430 nm) and emitter filter (680 nm) set for chlorophyll fluorescence. The wound was made by crushing a 1-cm length of the midrib with a scalpel. Images of the injured portion of the leaf were captured by the change in the fluorescence intensity, using a cooled CCD (Photometrics, Germany), digitized, and processed simultaneously using Meta view imaging series™ software (Nippon Roper, Universal Imaging Co.).

To examine the injury anatomically, leaf segments (0.6 mm^2), obtained from the injured area 7 days after wounding, were dehydrated with an ethanol series, embedded in resin (Technovit 7100, Kulzer, Germany), and sectioned at $8 \mu\text{m}$ with a microtome.

Results and Discussion

In 6 species of the Acanthaceae and 13 species of the Gesneriaceae plants, leaf injuries were observed in wounded detached leaves or in intact leaves on the cut stems a few seconds after those stimuli (Table 1, Fig. 1A, B). These injuries, which were observed only in young

leaves of vigorously growing plants, appeared only on sunny days. *Ruellia macrantha* in Acanthaceae and *Streptocarpus* genus and *Saintpaulia ionantha* in Gesneriaceae were the most sensitive plants with more than 50% of the leaf area injured after local wounding (Table 1). In these plants, the young leaves were often injured even by the removal of the basal leaves (Fig. 2).

Under the fluorescence microscope, a rapid decline of fluorescence intensity was confirmed in the injured area of the *R. macrantha* leaf. When a part of a detached leaf was wounded by crushing, fluorescence intensity declined rapidly across the leaf, starting from near the injured site to an area distant from the wound within a few seconds. The irregular shape of the injured area, which was confirmed by a decline of luminescence, coincided with that of the brown area in the leaf which was taken 1 hr after wounding (Fig. 3). The injury did not subsequently enlarge. The decrease of fluorescence intensity was observed in other injured plants and other organs, such as bracts or calyxes, after detachment of the shoot or peduncle from the mother plant (data not shown). Such a rapid decline of chlorophyll fluorescence intensity has not been reported in other plants except in *Saintpaulia*, which was directly induced by a rapid drop in leaf temperature with cold water (Yun et al., 1998). However, the mechanism of this rapid response is still unknown.

Other kinds of stress besides wounding could also induce leaf injury in the wound-sensitive plants described in Table 1; e.g., a sudden temperature drop in Gesneriaceae and Acanthaceae plants (Yun et al., 2001). Those injured plants (Table 1) were frequently injured by overhead irrigation even with water at room temperature during propagation by leaf or shoot cuttings or transplanting in a glasshouse (unpublished). The anatomical features of the wound injury (Fig. 1C) were identical with those of temperature drop shock (Elliot, 1946) in that the injured

portion was restricted to the palisade cells. The responses were also rapid in both cases as the injury appears within a few seconds, but in our observations, only wounding triggers leaf injury at a site distant from the stimuli. Species that are vulnerable to wound or other mechanical stimuli, such as temperature drop shock, rubbing and touch, are identical in the Acanthaceae and Gesneriaceae plants.

Wounding is generally done under cultural and propagating conditions such as leaf- or shoot-cutting, grafting or transplanting, and may trigger leaf injury. It is well known that plants respond to mechanical stress by adjusting their growth and development, by shortening and thickening the stem (Jaff, 1980). They also acquire toughness and hardness as 'mechanical defenses' (Lucas et al., 2000), or show 'chemical defenses', such as a systemic induction of defensive genes (Ryan and Pearce, 1998) in response to mechanical stress. We conclude that Acanthaceae and Gesneriaceae acquired specific responses to wounding, which leads to a systemic cell death but whose function and mechanism remain unclear.

Literature Cited

- Elliot, F. H. 1946. Saintpaulia leaf spot and temperature differential. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 47: 511-514.
- Jaff, M. J. 1980. Morphogenetic responses of plants to mechanical stimuli or stress. Bioscience 30: 239-243.
- Lucas, P. W., I. M. Turner, N. J. Dominy and N. Yamashita. 2000. Mechanical defences to herbivory. Annal. Bot. 86: 913-920.
- Ryan, C. A. and G. Pearce. 1998. Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14: 1-17.

Virginie, F. and G. A. Elbert. 1976. The miracle houseplants. p. 2-42. Crown Press, New York.

Yun, J. G., T. Hayashi, S. Yazawa, T. Katoh and Y. Yasuda. 1998. Abrupt and irreversible reduction of chlorophyll fluorescence associated with leaf spot in *Saintpaulia* (African violet). *Scientia Hort.* 72: 157-169.

Yun, J. G., S. J. Yang, T. Hayashi and S. Yazawa. 2001. Leaf injury induced by temperature drop shock in Gesneriaceae and Acanthaceae plants. *Kor. J. Hort. Sci. & Technol.* 19: 153-158.

キツネノマゴ科およびイワタバコ科植物でみられる有傷部から離れた葉の健全部に生じる褐変現象

梁 修静・細川宗孝・林 孝洋・矢澤 進

京都大学農学研究科 606-8502 京都市左京区北白川追分町

摘要

傷刺激によって刺激部から離れた健全な葉（個体内）が瞬時に褐変する現象が発見された。栽培種を含む 6 種のキツネノマゴ科、13 種のイワタバコ科植物においてこの現象が認められた。葉および茎の切断または葉の一部への傷つけ処理によって、離れた健全葉に障害が発生した。障害部は柵状細胞に限られ、褐変部は数日後黄変したが、葉の枯死はなかった。傷つけ処理の数秒後に有傷部位から離れた健全部でクロロフィル蛍光強度が不可逆的に減少することが確認され、非常に速い反応であることが示された。この現象は、傷を含む物理的ストレスによる植物の新たな応答反応の存在を示唆するものである。

Table 1. Systemic injury induced at sites distant from the wound in leaves of Acanthaceae and Gesneriaceae plants.

Plant	Injury ²
Acanthaceae	
<i>Barleria repens</i>	○
<i>Beloperone guttata</i>	×
<i>Crossandra infundibuliformis</i>	×
<i>Eranthemum pulchellum</i>	×
<i>Fittonia</i> spp.	×
<i>Hemigraphis okamotoi</i>	○
<i>Hypoestes phyllostachya</i>	×
<i>Ruellia barbielana</i>	○
<i>Ruellia humilis</i>	○
<i>Ruellia macrantha</i>	⊙
<i>Ruttya fruticosa</i>	×
<i>Schaueria calycotricha</i>	×
<i>Strobilanthes japonica</i>	○
<i>Strobilanthes cusia</i>	×
<i>Thunbergia vogeliana</i>	×
Gesneriaceae	
<i>Achimenes</i> spp. cv. Clouded yellow	○
<i>Achimense</i> × <i>Smithiantha</i> cv. Aquarias	○
<i>Chirita sinensis</i> cv. Dwarf	×
<i>Columnnea</i> spp. cv. Aladdins Lamp	○
<i>Columnnea longiflora</i> cv. Alba	○
<i>Corytoplectus congestus</i>	○
<i>Gloxinia speciosa</i>	○
<i>Gloxinia silvatica</i>	○
<i>Nemathanthus fissus</i>	○
<i>Nemathanthus</i> spp. cv. Rio	○
<i>Saintpaulia ionantha</i>	⊙
<i>Streptocarpus saxorum</i>	⊙
<i>Streptocarpus</i> spp. cv. Boisenberry delight	⊙
<i>Streptocarpus holstii</i>	⊙

Detached young leaves were locally wounded by crushing and leaf browning was observed immediately.

² ⊙, injured severely (more than 50% of the leaf area was injured); ○, injured moderately (less than 50% of the leaf area was injured); ×, uninjured.

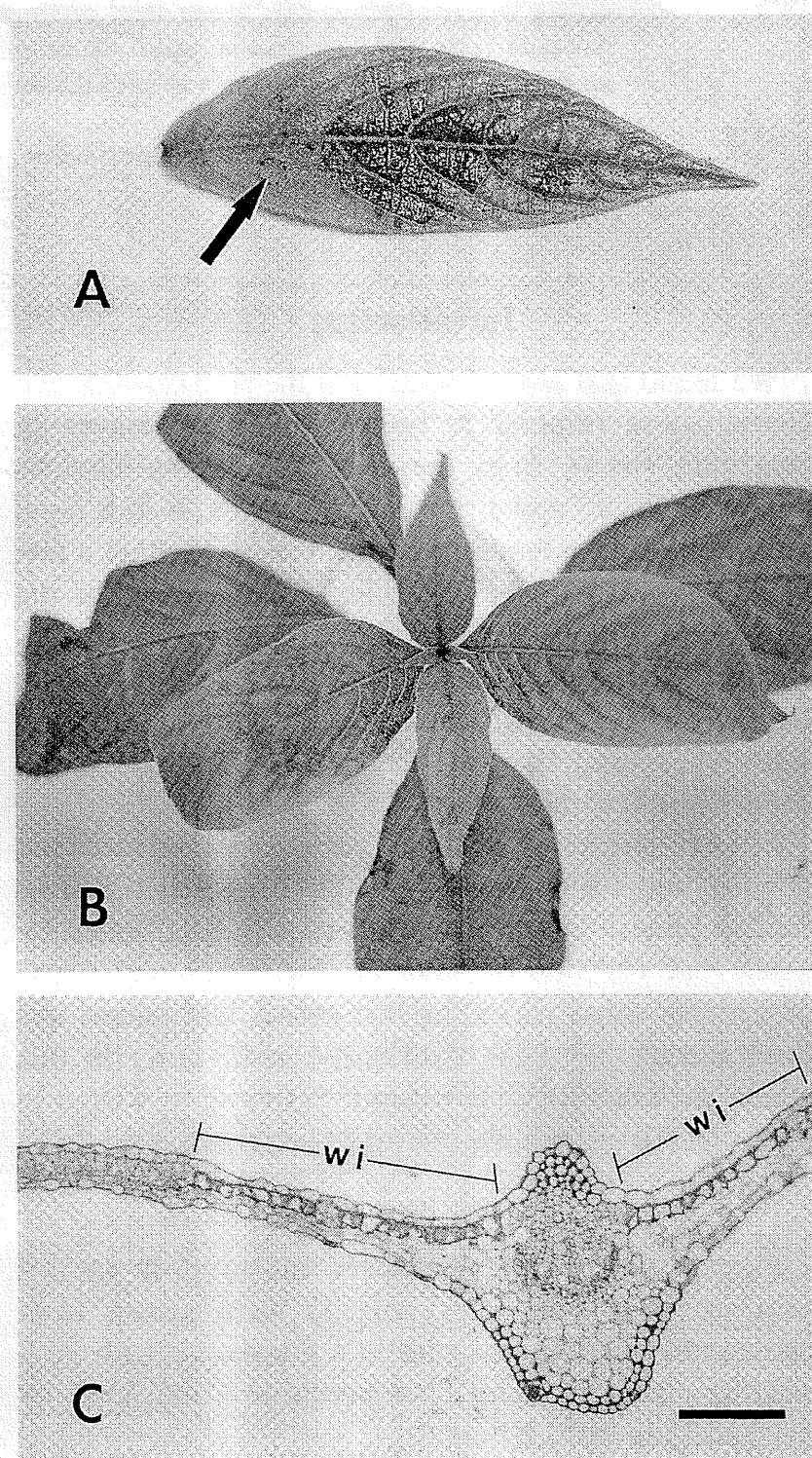


Fig. 1. Leaf injury induced by a local wound in *Ruellia macrantha*. A, leaf browning induced the wound by crushing with a leaf puncher (black arrow) in detached leaf; B, leaf browning induced by shoot cutting; C, leaf transverse section stained with toluidine blue solution, indicates injury of palisade layer (wi). Bar=200 μ m.

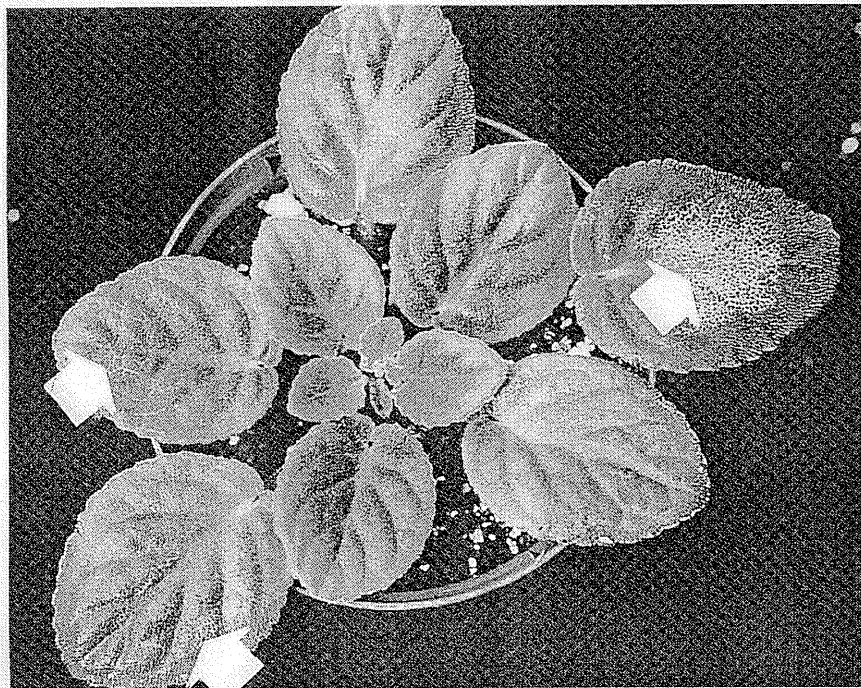


Fig. 2. Injury of young leaves induced by excision (detachment) of old leaves in *Saintpaulia ionantha* cv. Akira. More than five basal leaves were detached at once on a sunny day in a glasshouse. The photograph was taken more than a week after the treatment. White arrows indicate injured portion.

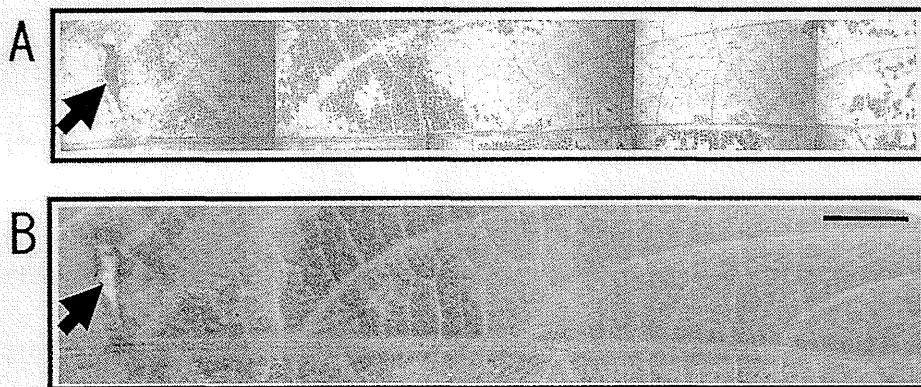


Fig. 3. The distribution of injury in a leaf after wounding at a distant site in *Ruellia macrantha*. A, Chlorophyll fluorescence image of leaf injury. The images were captured within 1 min after wounding. Black image shows the decline of fluorescence intensity (injury); B, The same part of the leaf with A was photographed 1 hr after wounding. The arrow indicates wounded site (1-cm length). Bar=1 cm.

第3章 赤外線画像解析から見たセントポーリアの葉温降下と葉の褐変障害の発生程度

Leaf temperature drop measured by thermography and occurrence of leaf browning injury in *Saintpaulia*

Summary

The relationship between the rate of temperature drop, observed by infrared video thermography, and leaf browning injury was investigated in *Saintpaulia*. The severity of leaf injury increased largely during the immersion of leaf (20°C) in water (5°C) for 10 sec, whereas no further increase in the severity of injury was observed thereafter. During 3 sec of leaf immersion at various temperatures of water, leaf injury was induced only when the rate of temperature drop was more than 3°C/s. In the case of decreasing leaf temperature from various initial temperatures (40°C, 35°C, 30°C), leaf injury was observed at smaller temperature difference between leaf and water when the initial leaf temperature was high. The rate of temperature drop was high when the leaf temperature at 33°C as dropped to 20°C (3.5°C/s) rather than from 23°C to 10°C (3.2°C/s), resulting in 53% and 32% injury on the leaf, respectively. The temperature drop of coated leaves following immersion in 7°C water showed a lower rate of temperature drop than uncoated leaves, resulting in 1/30 times of the injury in uncoated leaves. In addition, the severity of the injury decreased as the size of a water droplet decreased due to the slow drop in leaf temperature. The results suggest that a gradual drop in leaf temperature inhibits leaf injury even though the temperature difference between water and leaf is large.

緒言

セントポーリア (*Saintpaulia*) では頭上かん水による葉の褐変障害が栽培管理上大きな問題となっている。褐変障害の程度は頭上かん水によって生じる葉温降下に比例して大きくなると言われている (Elliott, 1946 ; Okada et al., 1973 ; Maekawa et al., 1987)。この結果は障害が葉温の急激な低下に起因することを示唆しており、葉表面から熱が奪われる速度は、かん水時の水温、室温、葉温および葉表面での水の付着量などに影響されるものと考えられる。しかし、葉の表面温度が実際どのように変化し、障害発生にいたるのかについて詳細なことは分っていない。

サーモグラフィを用いる熱画像解析により、生体内に生ずる温度変化をリアルタイムで観察することができる。植物学への応用としては、凍害の組織学レベルでの解析 (Wisniewski et al., 1997 ; John et al., 2001 ; Wisniewski et al., 2002) や、植物集団における蒸散量、光合成速度および公害物質の吸収などの解析 (Omasa et al., 1993) などに見ることができる。本報では、サーモグラフィを用いた赤外線熱画像解析を用いて、水との接触により変化するセントポーリアの葉表面温度の変化を調べることで、葉温降下速度と障害程度との関係について調査した。

材料および方法

供試植物としてセントポーリア (*Saintpaulia*) spp. cv. Ritali を用いた。母株より葉挿しによって増殖したものをプラスチックポット (直径 10 cm) に定植した。鉢土としてパーミキュライト、ピートモス、パーライトを 5 : 3 : 2 (v/v) の割合で混合したものを、月 1 回の頻度で花工場 (N : P₂O₅ : K₂O = 5 : 10 : 5, タケダ, 東京) 1000 倍液をかん水によって施肥した。供試株は、寒冷紗により 80~90% 遮光条件とし、温度 15~35℃としたガラス温室内で育成した。本葉 15~30 枚を付けた成株を実験に使用し、

葉柄を 2~3 cm 付けて切り取った葉齡の揃った個葉（展開葉第 10~20 枚目）あるいは植物体をそのまま実験に用いた。個葉を実験に用いる際には、切り取った葉を 23℃の恒温条件下に移し、切り口を水挿しした状態で処理まで 1 時間置いた。葉温降下処理は、所定の温度に調節した水に葉身全体が浸るようにして 3 秒間浸漬することで行った。処理はすべて室温 23℃に設定した実験室内で行った。

葉温は、浸漬処理前と浸漬処理直後の葉を直ちにサーモグラフィ（TH51-701, NEC, Japan）により撮影した。TH51 熱画像処理プログラムにより葉面積当たりの平均温度を求めた。葉温の変化は、（処理前の平均葉温 - 処理直後の平均葉温）とした。障害程度は、（障害面積/処理した葉面積×100）から求め、障害面積は処理 1 日後の障害葉を画像解析することにより求めた（Yun et al., 1996）。

（実験 1）処理方法の違いが葉温降下と障害程度に及ぼす影響：5℃に設定した水に葉身全体が浸るよう 1, 5, 10, 20, 30, 50 秒間浸漬し、それぞれの浸漬時間における葉温変化および葉の障害程度を求めた。また、5℃の水を葉面から 5 cm の距離で 2.4 ml/回のハンドスプレーを用い 1 秒間 1 回の間隔でスプレーを 50 回行い、スプレー回数による葉温変化および葉の障害程度を求めた。葉温の変化は、浸漬後水から出した直後の葉あるいはスプレー処理直後の葉をサーモグラフィにより撮影することによって求めた。

（実験 2）葉温降下速度と障害程度との関係：葉を 5℃, 7℃, 10℃または 15℃に設定した水に 3 秒間浸漬し、それぞれの処理における葉温の変化をもとに葉温降下速度（℃/秒）を求めた。また、葉の障害程度を調べ、葉温降下速度との関係を求めた。

（実験 3）処理前の葉温の違いが葉温降下速度と障害程度に及ぼす影響：所定の温度の水（23℃と 33℃）に 3 分間葉を浸漬し、異なる葉温の葉を用意した。直ちにすべての葉は温度較差が 13℃になるように設定した 10℃または 20℃の水に 3 秒間浸漬した。浸漬処理による葉温の変化と障害程度を求めた。また、温室内（気温 20℃, 相対湿度 45±5%）で植物体を用いて所定の温度の水（25℃, 30℃, 35℃, 40℃）に地上部全体

を水に浸るよう 3 分間浸漬することで葉温が異なる株を用意した。ただちに地上部全体を温度較差がそれぞれ 10℃, 15℃と 20℃に設定した水に 5 秒間浸漬し, 直ちに障害発生葉の有無を調査した。

(実験 4) 葉の被覆処理が葉温降下速度と障害程度に及ぼす影響: 葉の被覆による影響を調べるため, 葉の向軸側の表面全体をワセリンで薄く被覆した葉と被覆していない同じ葉温の葉を用意し, 7℃に設定した水に 3 秒間浸漬した。浸漬処理による葉温の変化と障害程度を求めた。

(実験 5) 葉に付着する水滴の大きさが葉温降下速度と障害程度に及ぼす影響: マイクロピペットにより所定温度の水滴 10~100 μ l を葉面直上から滴下した 3 秒後の水滴底面積当たりの葉温変化を求めた。また, 水滴 1~20 μ l を滴下した後の障害程度 (障害面積/水滴底面積 \times 100) を実体蛍光顕微鏡下で水滴付着 1 分以内のクロロフィル蛍光強度低下部分の画像から求めた (Yang et al., 2002)。

結果

(実験 1) 処理方法の違いが葉温降下と障害程度に及ぼす影響: 葉温約 20℃の葉を 5℃の水に浸漬した場合, 浸漬時間が 5~10 秒で葉温は 12~13℃低下し, 水温に近い温度であった 7~8℃にまで下がった (Fig. 1A)。浸漬時間が 10~50 秒と長くなっても葉温はそれ以上低下せず, その間の障害程度は 35~42%でほぼ一定であった。1 秒間の短い浸漬時間において葉温は約 9℃低下し, その時の障害程度は 5%であった。葉温が水の温度まで低下している 1~10 秒の間では, 葉温較差が大きいほど障害程度は大きかった。一方, 5℃の水を 1 回/秒の間隔でスプレー処理した結果, 葉温は 15 秒間でゆっくりと 10℃低下した (Fig. 1B)。スプレー処理を続けた 50 秒間で葉に全く障害は発生しなかった。葉温が 9℃低下するのに, 5℃の水への浸漬処理が 1 秒を要したのに対しスプレー処理は 15 秒を要しており, 葉温が速く低下した浸漬処理でのみ葉に障害が発

生した.

(実験 2) 葉温降下速度と障害程度との関係: 室温に置いた葉を異なる水温の水 (5~15°C) に 3 秒間浸漬した結果, 単位時間当たりの葉温較差 (葉温降下速度と定義する) が約 3°C/秒を超えたところで障害発生が見られた (Fig. 2). 葉温降下速度が 3°C/秒以下であれば, 障害の発生が見られなかった. 葉温降下速度が 3°C/秒を超えた場合は, 速度が大きいほど障害程度が大きくなる傾向を示した.

(実験 3) 処理前の葉温の違いが葉温降下速度と障害程度に及ぼす影響: 葉温 25°C から 40°C までの無傷の成株を用いて, 5 秒間 10, 15 および 20°C の葉温降下処理を行った結果, 処理前の葉温によって障害が発生する温度較差に大きな差が見られた (Table 1). つまり, 温度較差が 10°C の場合, 40°C→30°C の処理でのみ障害が発生し, 35°C→25°C, 30°C→20°C, 25°C→15°C では障害が見られなかった. 温度較差が 15°C の場合, 40°C→25°C と 35°C→20°C では障害が見られたが, 30°C→15°C と 25°C→10°C では障害が見られなかった. 温度較差が 20°C の場合は全ての処理区において障害が見られた. 従って, 葉温 40°C, 35°C そして 25°C の株においては, 葉温が高いほど少ない温度較差の水温によって障害が発生した. 葉温 33°C および 23°C の葉を用意し, 温度較差が同じく 13°C になるようそれぞれ 20°C および 10°C の水に浸漬した結果, 処理前の葉温によって異なる温度変化を示した. 浸漬 3 秒間で 33°C の葉と 23°C の葉は, それぞれ 10.5°C (3.5°C/秒) と 9.7°C (3.22°C/秒) の葉温降下を示した (Table 2). その時の障害程度はそれぞれ 53.4% と 31.8% を示した.

(実験 4) 葉の被覆処理が葉温降下速度と障害程度に及ぼす影響: ワセリンで葉の向軸面を被覆した葉と被覆していない葉を 7°C の水へ 3 秒間浸漬した結果, それぞれ 8.8°C (2.9°C/秒) と 13.1°C (4.4°C/秒) の葉温降下を示した (Table 3). 葉の表面を被覆することで単位時間当たりの温度変化が小さくなった. 被覆した葉としていない葉の障害程度はそれぞれ 1.4% と 41.9% を示した.

(実験 5) 葉に付着する水滴の大きさが葉温降下速度と障害程度に及ぼす影響: 水温

7℃の水を水量 10 μ l, 50 μ l そして 100 μ l で葉 (23℃) の表面に落とした場合, 水滴が占める葉底面積当たりの温度降下は水滴が付着した 3 秒間でそれぞれ 5.8℃ (1.9℃/秒), 7.3℃ (2.4℃/秒) そして 8.4℃ (2.8℃/秒) を示した (Fig. 3A). また, 水温 5℃の水を水量 1~20 μ l で葉の表面 (25℃) に落とした場合, 水滴が占める葉底面積当たりの障害程度は水滴量が多くなるほど大きくなった. 20 μ l の場合は水滴量 1 μ l と 2.5 μ l の場合に比べ約 5 倍の障害面積を示した (Fig. 3B). 従って, 水滴量 (水滴の付着底面積) が多いほど葉温降下速度が速くなるため障害程度が大きくなることが示唆された.

考察

セントポーリアで発生する葉の褐変障害の程度は, 葉と浸漬する水の温度較差と密接に関係している (Elliott et al., 1946; Maekawa et al., 1987). 今回サーモグラフィを用いた赤外線熱画像解析により葉の表面温度を測定した結果, 葉を低温の水に浸漬してから 5 秒以内で葉温が大きく低下しており, この間に障害程度が大きく進行することが示唆された (Fig. 1A). この結果から, 障害の発生は低温ではなく葉温の急激な低下に起因することが改めて示された. この結果は Maekawa et al. (1987) の浸漬時間による障害程度の結果と一致している. 我々は葉温が急激に低下した浸漬処理数秒間に着目し, その間の葉温降下速度と障害程度との関係を検討した.

様々な温度の水へ葉を一定時間浸漬した結果, 浸漬 3 秒間の葉温変化が 3℃/秒を超えた処理において障害が発生した (Fig. 2). 急激な葉温降下による葉の褐変は不可逆的な障害であり, 葉温の変化 3℃/秒が一定時間 (ここでは 3 秒) 続くのは障害発生の閾値といえる. 葉を水に浸漬する処理と水をスプレーする処理では, 葉温が同じく 9℃低下した間に浸漬処理のみにおいて障害が発生した (Fig. 1). この結果も, 浸漬処理のみでこの閾値を超えたためと考えられる. 葉の表面を被覆し 7℃の水に浸漬した結果, 葉温が単位時間当たりゆっくりと低下し, 結果的に被覆していない葉に比べ障害

がほとんど発生しなかった (Table 3). 被覆することによって葉温低下が緩かったのは、表面がぬれにくく、表面張力が少なくなることによるものと考えられる (鈴木, 1998).

Maekawa et al. (1987) によると、葉温を段階的に低下させた場合には、比較的低温の水によっても障害が発生しなかったとしている。被覆による障害程度の軽減は、温度較差が大きい温度の水であっても葉温の変化を緩くする条件では障害の発生を抑えることができることを示唆している。

同じ温度較差処理によっても浸漬前の葉温の違いによって葉温降下速度に違いが認められた (Table 2). 葉温が高いほど所定の温度較差に対して葉温降下速度が速く、その結果障害程度も大きかった。この結果は、3 秒間の葉温降下速度が閾値の $3^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ を越えた場合、その速度が速いほど葉の障害程度が大きくなることを示している。しかし、今回の結果からは葉温が高いことが葉の温度降下に対する感受性を高める可能性については不明である。無傷の植物体を用いて浸漬処理した時も、葉温が 30°C , 35°C また 40°C と高くなるにつれて小さい温度較差によって障害が発生した (Table 1). この結果も葉温の違いによる葉温降下速度の違いに起因するものと考えられる。しかし、無傷の葉が切葉に比べ障害の発生する温度較差が大きかった理由については不明である。異なる品種ではあるが、Maekawa et al. (1987) は様々な葉温の切葉の何れにおいても $5\sim 10^{\circ}\text{C}$ の温度較差によって障害が発生するとしており、Okada et al. (1973) は葉温と水温に差がない時にも軽度の障害が発生したとしている。このような感受性の違いは葉を切断する操作の有無 (Yang et al., 2003) あるいは栽培環境の違い (Yun et al., 1997) に起因するものだと推測される。Okada et al. (1973) は、セントポーリアの葉温が室温によって異なり、室温 20°C の栽培では葉温が室温を $3\sim 4^{\circ}\text{C}$ 上回ると指摘している。その要因として、昼間の乾燥による気孔の閉鎖あるいは葉の構造的な特徴などが考えられる。我々の観察によると、昼温が高い日の夜間における頭上かん水によって葉に褐変が発生しやすい。このような事実からも、室温と水温のみを目安としたかん水は危険である。今回の結果は、葉温が高い時には比較的高い温度の水によっても

障害が発生しうることを示している。

様々な量の水滴を用いて葉温降下を行った結果は、水滴量（水滴が占める底面積）が大きいほど障害程度が大きくなった（Fig. 3B）。また、水滴量が大きいほどその付着面あたりの葉温降下が速くなった（Fig. 3A）。同じ水温の水であっても水滴が細かいほど葉からの熱損失が少ないため（Fig. 1B, Fig. 3A）、たとえ水温が低い場合でもミストあるいは噴霧によるかん水は褐変障害の発生を抑制するのに役立つと考えられる。

以上の結果から、頭上かん水による葉の褐変障害は、葉温が急激に低下することが原因であり、その時の障害程度は、ある閾値を超えた葉温降下速度に起因することが示唆された。日本のセントポーリア栽培農家では葉の褐変障害を防ぐため1年を通して主に底面かん水を行っている。しかし、セントポーリアは葉面が濡れることで気孔を開き生育が促進されることを考慮すると（Hayashi et al., 1999）、頭上かん水を並行することが望ましいと思われる。葉温が25℃以下の時には10℃の水によっても障害は発生しないため（Table 1）、葉温が低い冬期のハウス内栽培においては通常の頭上かん水を行い、夏期においては細かいミストによるかん水を行うことにより障害発生が軽減されるものと考えられる。

文献

- Elliott, F. H. 1946. *Saintpaulia* leaf spot and temperature differential. Amer. Soc. Hort. Sci. 47: 511-514.
- John, C., Rex, B., Michael, W. 2001. Patterns of ice formation and movement in blackcurrant. HortSci. 36: 1027-1032.
- Hayashi, T., Takatsuki, S., Goi, N., Yazawa, S. (林 孝洋, 高槻紫央, 五井伸明, 矢澤 進) 1999. Stomatal response to wetness of the leaf in *Saintpaulia*. (Japanese) 園学要旨 68 別 2 : pp 386.
- Maekawa, S., Torisu, Y., Inagaki, N., Terabun, M. (前川 進・鳥巢陽子・稲垣 昇・寺分 元一) 1987. Leaf injury caused by drop in leaf temperature of *Saintpaulia ionantha*. (Japanese text with English abstract) J. Japan. Soc. Hort. Sci. 55: 484-489.
- Okada, M., Abe, T., Watanabe, H., Koyama, H. (岡田正順・阿部恒充・渡辺 弘・小山弘道) 1973. 葉面かん水によるイワタバコ科花き類の葉やけについて. (Japanese text) 園学要旨. 昭 48 春 : 356-357.
- Omasa, K., Shimizu, H., Ogawa, K., Masuki, A. 1993. Diagnosis of trees from helicopter by thermographic system. Environ. Control Biol. 31: 161-168.
- Suzuki, N. (鈴木信夫) 1998. 熱量測定・熱分析ハンドブック. (Japanese text) Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis (日本熱測定学会編), Tokyo, pp 3-34.
- Wisniewski, M., Lindow, S. E., Ashworth, E. N. 1997. Observation of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. Plant Physiol. 113:327-334.
- Wisniewski, M., Glenn, D. M., Fuller, M. P. 2002. Use of a hydraulic particle film as a barrier to extrinsic ice nucleation in tomato plants. J. Amer. Soc. Hort. Sic. 127: 358-364.
- Yang, S. J., Hosokawa, M., Hayashi, T., Yazawa, S. 2002. Leaf browning induced at sites distant from wounds in Acanthaceae and Gesneriaceae plants. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 71:

535-537.

Yang, S. J., Hosokawa, M., Hayashi, T., Yazawa, S. 2003. Wounding enhances rapid-browning responsiveness of distal unwounded leaves to water stimulus in *Ruelliamacrantha*.

J. Japan. Soc. Hort. Sci. 72: published.

Yun, J. G., Hayashi, T., Yazawa, S. 1996. Precise quantification of leaf spot in *Saintpaulia* by image analysis with a transmitted light. *Environ. Control Biol.* 34: 329-334.

Yun, J. G., Hayashi, T., Yazawa, S. 1997. Diurnal changes in leaf spot sensitivity of *Saintpaulia* (African violet). *Scientia Hort.* 70: 179-186.

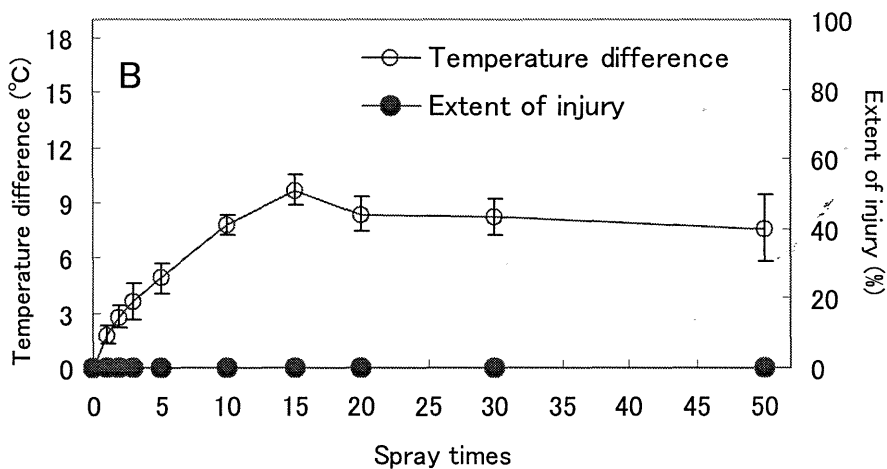
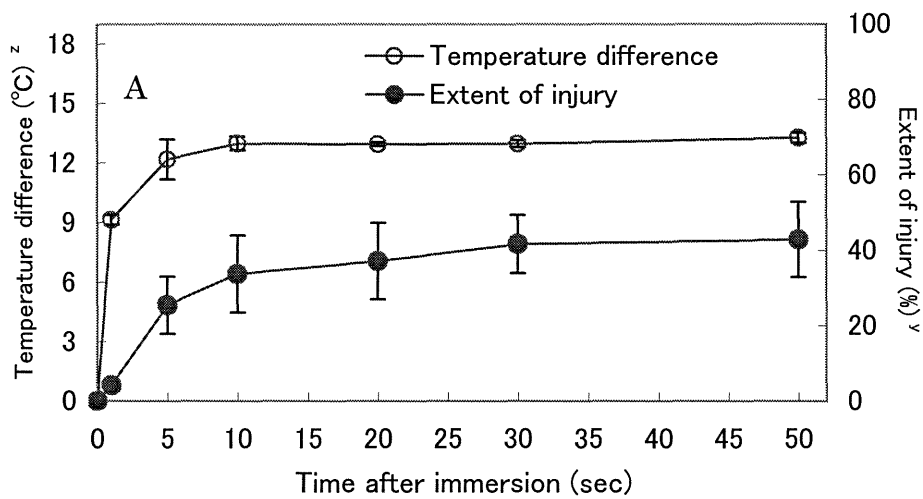


Fig. 1. Time course of leaf temperature and leaf injury at low water temperature. A. Immersion treatment or B. Spray treatment was conducted using detached individual leaves for different time lags (from 1 sec to 50 sec). ^z (Leaf temperature before the treatment - leaf temperature immediately after the treatment). In the case of immersion treatment, leaf temperature was detected immediately after removing the leaf from water. Leaf temperature was monitored by thermography as an average temperature of leaf surface. ^y (Browned area/leaf area) × 100. Vertical bars indicate SE.

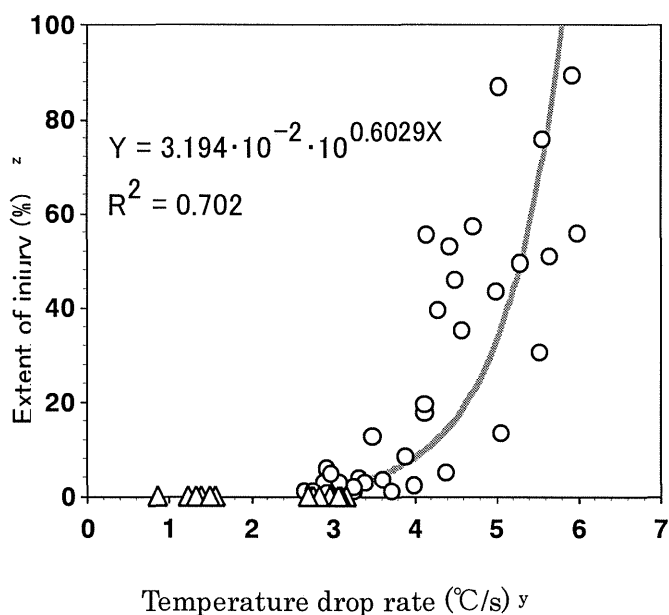


Fig. 2. Relationship between leaf temperature drop rate according to water temperature and severity of leaf injury. ^z The same as in Fig. 1. ^y Change in leaf temperature per second calculated from the temperature difference during 3 sec of immersion.

Table 1. Effect of initial leaf temperature on the incidence of leaf injury during temperature drop. ^z The same as in Fig. 1. ^y The upper part of the plantlet was immersed in water with the previous higher temperature of water for 3 min to make the leaf temperature uniform and then immersed for consistency in the next lower temperature of water for 5 sec. The shaded parts indicate where the leaf browning occurred.

Temperature difference (°C) ^z	Higher temperature → Lower temperature (°C) ^y			
10	40→30	35→25	30→20	25→15
15	40→25	35→20	30→15	25→10
20	40→20	35→15	30→10	25→5

Table 2. Effect of initial leaf temperature on the leaf temperature drop rate and the severity of leaf injury during the temperature drop at the same interval.

^z, ^x The same as in Fig. 1. ^y The same as in Fig. 2. ^w The average of 10 individual leaves \pm SE.

	Leaf temperature ($^{\circ}$ C)	
	33	23
Temperature difference ($^{\circ}$ C/3 s) ^z	10.50 \pm 0.3 ^w	9.70 \pm 0.5
Temperature drop rate ($^{\circ}$ C/s) ^y	3.50 \pm 0.1	3.22 \pm 0.2
Extent of injury (%) ^x	53.40 \pm 13	31.80 \pm 15

Table 3. Effect of leaf coating on the temperature drop rate and the severity of injury. Detached leaves (23° C) coated with vaseline or not were immersed in water (7° C) for 3 sec. ^z, ^y, ^x The same as in table 2. ^w The average of 10 individual leaves \pm SE.

	Uncoated leaf	Coated leaf
Temperature difference ($^{\circ}$ C/3 s) ^z	13.1 \pm 3.6 ^w	8.8 \pm 1.8
Temperature drop rate ($^{\circ}$ C/s) ^y	4.4 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1
Extent of injury (%) ^x	41.9 \pm 4.7	1.4 \pm 0.5

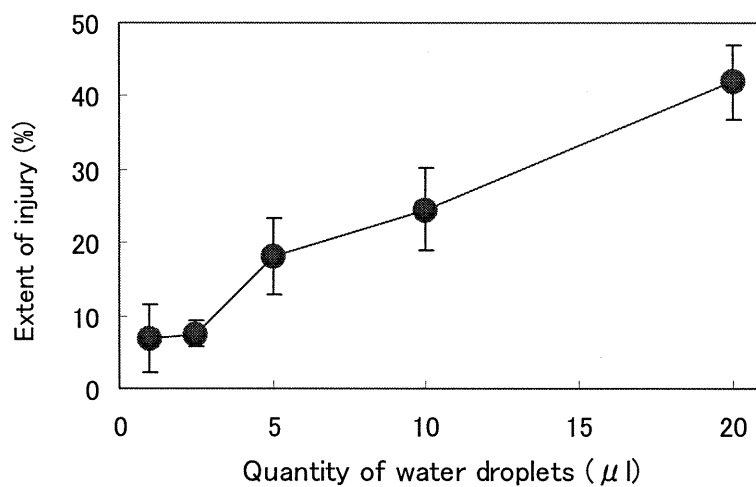
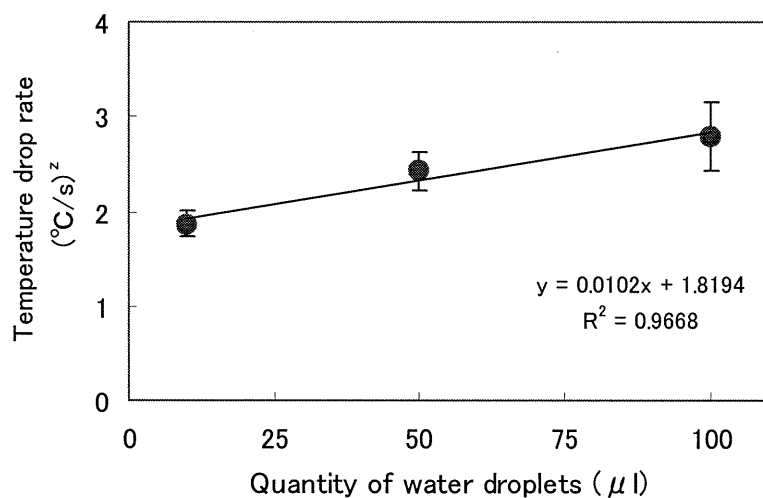
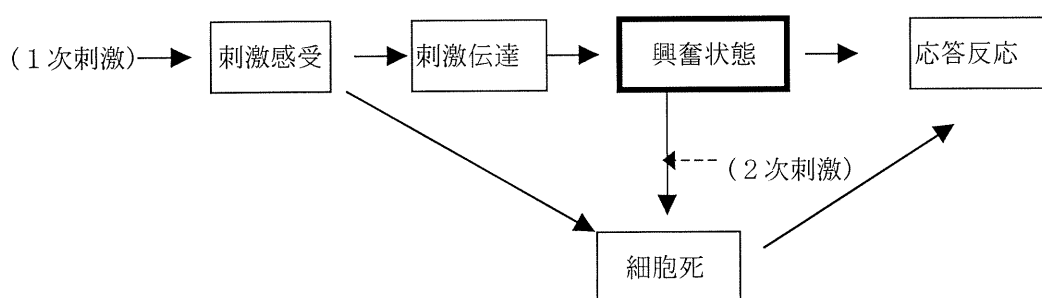


Fig. 3. Effect of quantity of water droplets on temperature drop rate and severity of leaf injury. A. Effect of quantity of water droplets on the temperature drop rate, which was monitored on the leaf surface for each water droplet 3 sec after dropping. ^z The same as in Fig. 2. B. Effect of quantity of water droplets on the severity of leaf injury, which was detected on the leaf surface for each water droplet.

第4章 物理的刺激によって誘導される植物の興奮状態の検討

植物は外部環境の変化に常にさらされており、それらを認識する機構を持つことで、植物の発達へ影響、環境応答・適応することができる。植物が生育に非適切な環境に対して徐々に純化できること、害虫の刺激に対して防御反応をしめすこと、物理的刺激に対して生育遅延など様々な生理反応を示すことなどは、感受した外部刺激を聞きわけ、植物全体に伝える機構を持っているからである。そのため、植物は一定な状態ではなく、常に環境変化に対して変化しやすいものと考えられる。

イワタバコ科やキツネノマゴ科では、植物の一部を傷つけることで、植物全体が敏感な状態（興奮状態）となり、次くる刺激に対して簡単に傷害を受けてしまう植物が存在する。これらの植物で見られる興奮状態が、植物にとってどのような状態なのか、生育発達においてどのような意義を持つのかは分からないが、おそらくこのような状態が植物全般において存在するものと思われる。物理的刺激によって傷害を受ける植物を用いて興奮状態を調べることは、頭上かん水や傷刺激によって発生する葉の黄変障害（リーフスポット）を解明するに当たって重要な手がかりになるものと期待される。



第1図 イワタバコ科とキツネノマゴ科植物の物理的刺激後応答反応まで予想される段階

1. 興奮状態の誘導

(興奮状態の誘導を確認する方法) 1次刺激(切り取り)を与えた後、2次刺激(室温の水に植物体を数秒間浸水、軽い接触)を処理し、葉に褐変が見られた時を興奮状態と見なした。対照区としては、毎度1次刺激直後の植物体を用いて2次刺激処理を行い、傷害が発生しないことを確認した。実験共通の材料として、セントポーリア、ストレプトカルパス、ルエリアを用いた。

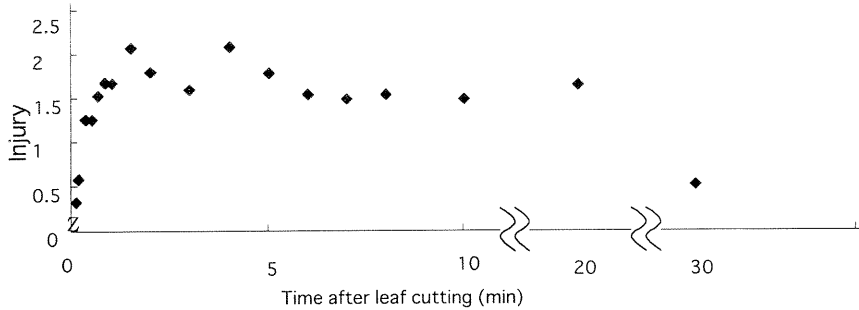
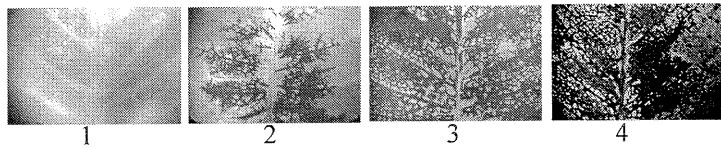
1) 興奮状態を誘導可能な刺激:

傷つけ(茎や花茎、葉柄の切り取り、茎の管状剥皮)、物理的刺激(強い接触、頭上かん水)、温度ショック

2) 1次刺激後誘導される興奮状態の経時変化:

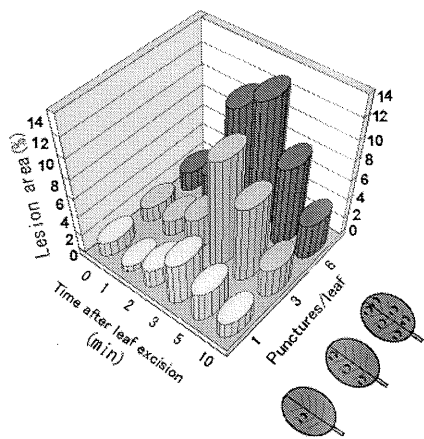
(方法) 葉を植物体から切り取り、興奮状態の誘導確認として葉面の軽い接触を行った。また、興奮状態時の葉温低下や傷つけ処理に対する感受性を調べた。葉を切り取った後、経時的にこれらの2次刺激処理を行った後、発生した障害部の面積を測定することで、葉内における興奮状態の誘導を評価した。

(結果) 個体が葉である場合、切り取った刺激が個体全体に伝わって興奮状態を誘導するには2-3分で十分であった(第2図)。誘導された興奮状態はその後徐々にうすくなり、この状態は刺激によって一時的に誘導されるものと考えられた。また、2次刺激が強くなるにつれて障害を受ける可能性は高くなった(第3図)。褐変が発生する植物において葉を切り取るあるいは茎を切断する刺激は、無傷の植物では発生しない温度域の水に対して著しい障害を発生させた(第4図)。



第2図 *Streptocarpus holstii* の葉を切り取った後に誘導される葉の興奮状態の経時変化
 切り取った葉は興奮状態の誘導を確認（葉面の軽い接触）するまでに、室温（20℃）
 の光条件（ $250 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）下に置いた。障害程度の評価は、0. 全く傷害なし；1.
 障害が葉面積の約 10%以下をしめる；2. 障害が葉面積の 50%程度をしめる；3. 障害葉面
 積の 50%以上をしめるとした。異なるシュートからの若い葉 10 枚以上を用いた。

$$z = (1 \times \text{葉枚数} + 2 \times \text{葉枚数} + 3 \times \text{葉枚数} + 4 \times \text{葉枚数}) / \text{全葉枚数}$$



第3図 *Saintpaulia* の興奮状態が傷つけに対する葉の感受性に及ぼす影響
 葉を切り取った後、リーフパンチング（ 0.7cm^2 ）で傷つけ処理を行った。若い葉
 10 枚以上を用いた。

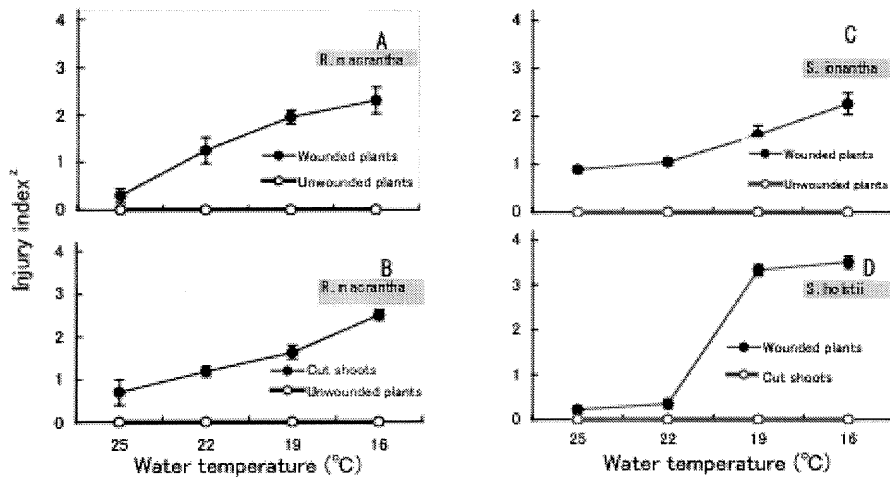


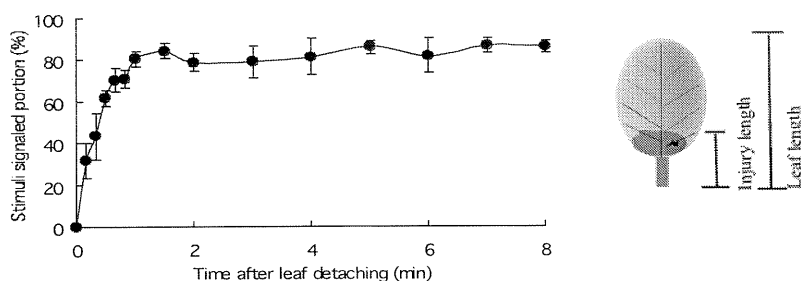
Fig. 4. Leaf browning in wounded and unwounded plants after a brief immersion (3 sec) in water at 25, 22, 19 or 16°C. The leaf temperature before immersion was 24-25°C. A, 4 leaves were cut off (wounded plants); B,D, Cut shoots length in 6-7 cm; C, 7-8 old leaves were cut off. Two minutes after wounding, wounded plants and cut shoots were immersed in water for 3 sec. Injury in the opposite leaves of the first and second nodes (A,B,D) and remained young leaves (C) was evaluated. Each symbols represent the mean injury indexes (See in Fig. 2) of 5-10 plants. Error bars represent SE.

3) 刺激部位から個体全体への興奮状態の進行速度

(方法) 大きさの揃った若い展開葉を切り取った後、経時的に興奮状態の進行速度を調べた。興奮状態に至った部位の確認は、葉面全体を軽く触ることで発生した障害部の最も離れた位置から切り取った切り口までの距離をもって測定した。また、上位の葉から節数の異なるシュートを用意し、シュート内における興奮状態の進行速度を調べた。興奮状態の確認のための処理としては、シュート全体を室温の水に浸水する処理を用いた。

(結果) 葉の切除刺激があった直後は、傷害が見られないか葉柄に近い基部のみで傷害

が確認されたが、切り取った1-2分後には葉の先まで傷害が確認され、3分後には葉の全面に至って強い傷害が確認された(第5図)。



第5図 *Streptocarpus holstii*の葉を切り取った刺激の進行速度

'Stimuli signaled portion (%)' = injury length/leaf length × 100.

Data represents means ± S.E. of 8 individual leaves.

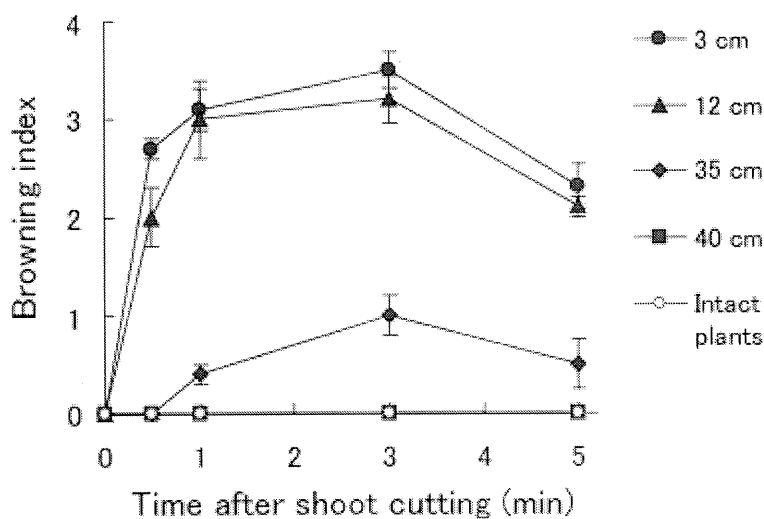


Fig. 6. Time course on the effect of cut shoot length on the incidence of leaf browning.

Shoots that were 3 to 40 cm long were briefly immersed in water (4°C lower than ambient temperature) at various intervals (0-5 min) after cutting. Browning index was determined in

Fig.2. Each point represents the mean of five shoots. Bars represent SE.

2. 興奮状態の誘導を抑制する方法

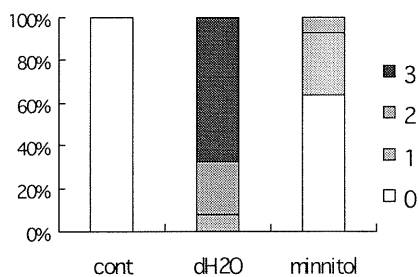
1) 蒸散を妨げる条件： 刺激が繋がっている組織のみに伝達されること、障害が葉脈周辺でよく観察されること、茎を切り取る刺激が若い葉（根からの物質移動が盛んだと思われる）に優先して伝達されることなどは、刺激が維管束を通過して伝わる可能性を示唆している。

①夜間（明期条件下でも）、雨天日： 湿度が比較的高い条件になるため、蒸散がほとんど起こらず、そのため刺激の伝達が鈍くなるものと考えられる（第7図）。

②高浸透圧の水溶液に切除した切り口を差挿し戻し：

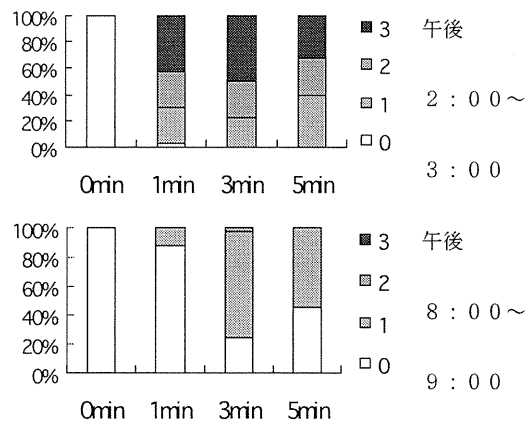
（方法） 切り口からの水揚げを抑制する条件として、マンニトール0.6Mの水溶液に切り取ったシュート（3節もの）を挿し、3分経過した後、常温の水にシュートを浸水処理し、葉の障害を確認した。

（結果） マンニトール水溶液に挿したシュートはマンニトールを含まない水溶液に挿したシュートに比べ、障害が著しく抑制された（第8図）。



第7図 切り口を高浸透圧水溶液に吸い上げ処理することによる興奮状態誘導の抑制

シュート15個以上を用い、葉80枚以上（100%）にしめる傷害の割合。Injury index (0-3) は障害発生なしを0とし、葉全面に障害が発生した時と3として評価した。

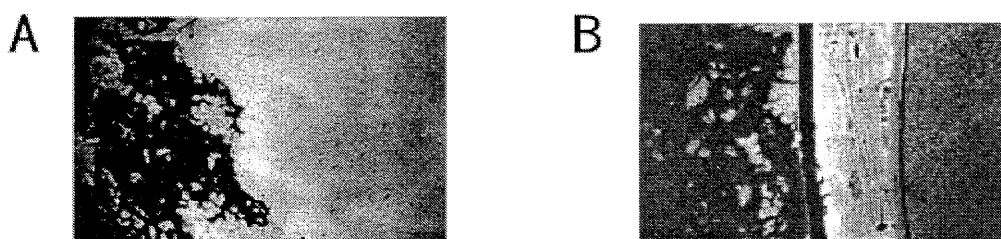


第8図 昼と夜の興奮状態誘導の差

*S.holstii*のシュートを切り取り、経時的に常温の水に数秒間浸水処理し、障害を確認した。シュート10個以上を用いた。Injury index (0-3) は第7図と同様。

以上の条件は、完全に障害を抑制することはできないが、高湿度により蒸散流の移動が抑制される条件、興奮状態誘導がかなり抑制される条件であり、刺激伝達が維管束を通った蒸散流の移動を伴うことを示唆している。

2) 葉面上の水滴あるいは寒天置き： 刺激を与える以前に葉の表面に水滴あるいは寒天が置かれた場合、その部分には刺激が伝われにくい（第9図）。この効果は刺激後数分以内のみ観察されることから、水滴や寒天が葉面に付着した時はその箇所のみ刺激伝達が遅れるものと考えられた。



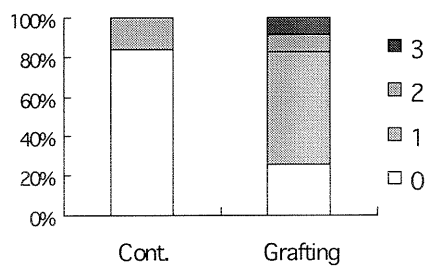
第9図 葉の表面に水滴（A）あるいは寒天（B）が付着することによる刺激伝達の遅延

3) 刺激に対する感受性が異なる植物間の接ぎ木：

（材料および方法） 物理的刺激に対する感受性の高い *Ruellia macrantha* (R m)、感受性の低い *Ruellia humilis* (R h)、全く障害発生が見られない *Ruellia barbielana* (R b) をそれぞれだいきとほぎとして組み合わせて接ぎ木した。ほぎの部分が数節ほど展開した時点でのほぎの葉を切り取って興奮状態誘導を調べた。

（結果および考察） 接ぎ木を行ってないものは処理葉の20%以下でわずかな障害の発生が見られたのに比べ、接ぎ木を行ったものは処理葉の70%以上の障害発生が認められた（第10図）。刺激の感受性が高いものに接ぎ木することで、興奮状態の誘導が促進されたものと考えられた。接ぎ木したものとしてないものの葉や茎の切片観

察では、特に形態的な差は認められなかった。全く障害発生が見られない Rb を Rm に繋いだものでは、興奮状態を誘導することができなかった。



第10図 接ぎ木 (Rm+Rh) を行った Rh の興奮状態誘導の変化

Cont は接ぎ木を行っていない Rh 個体。Injury index (0-3) は第7図と同様。

第5章 傷つけ処理がつくり出す褐変に対する過敏な状態（興奮状態）の生理的な特徴

本実験の背景および位置付け

多くのイワタバコ科およびキツネノマゴ科植物において共通した急激な葉の褐変障害が見られる。葉の褐変は、水や風による急な温度変化および傷つけ処理によって発生し、多くの場合は傷つけられたことで初めてこれらの刺激に対し褐変が発生する。褐変障害が発生するこれらの植物においては、傷つけの前歴が傷つけた葉を含め離れた健全葉の物理的ストレスに対する感受性を著しく高めることが分ってきた。この傷つけによる効果を‘興奮状態’と呼んでいる。興奮状態が誘導された植物においては常温の水との接触によっても葉が瞬時に褐変することから褐変指数 1~4 を興奮状態誘導の指標に用いている。また鋭利な切断によっては興奮状態がほとんど誘導されない。これらの性質を利用することで、1. 興奮状態は傷つけから数分後にピークに達し 30 分後にはその効果がなくなる一過性のものであること、2. 褐変が発生する植物種の汁液では褐変が誘導されても、褐変の発生しない種の汁液によっては褐変が誘導されないこと、3. 傷つけ部からの距離が短いほど、幼葉であるほど、高温乾燥条件であるほど興奮状態が誘導されやすい、などの情報を得ることが可能であった。褐変傷害が発生するこれらの植物においては、興奮状態が誘導されにくい条件（多湿、夜間、低温）に傷を伴う挿し木、植え替えならび摘葉処理などを行う時間帯を設定し、また傷つけを伴った場合には時間を空けて頭上かん水を行うことが望ましい。しかし、傷によるこのような効果は他植物では知られていないため、傷によるマイナ的影響には着目されてなく情報がほとんどない。植物の興奮状態を表すような生理的な指標あるいは遺伝子レベルの変化が分ることによって、前もって植物のストレスに対する感受性を予想し対処することも可能になるとと思われる。そのため興奮状態の生理的な特徴を続けて調べ、葉の他花にも傷が及ぼす影響について現在までの手法によって調べた。

実験 1. 傷つけ処理による茎流量の変化

興奮状態が傷刺激部から上位の葉のみに誘導されること、接木部を通過して穂木の葉へ伝達されることなどから、傷刺激は木部を通過して移動されるものと考えられる。さらに興奮状態に至った葉の葉内の水ポテンシャルが増大することが示された。これらの結果から、傷によって誘導される興奮状態は水の移動を伴う現象である可能性が考えられる。

材料および方法》草丈 30~50cm の *Ruelliamacrantha* を供試した。ダイナゲージ (SGX2) により蒸散流の測定を行った。茎流センサーを直径 4mm の茎に付着し、ヒーターの上下に位置した熱伝対からの温度差をもとに蒸散流量 (g/h) を求めた。傷つけ処理として 1. センサー付着部から下に約 4~8cm 離れた所で切断した, 2. センサー付着部から下についた葉 4~6 枚を切除した。センサー付着後値が安定してからこれらの傷つけ処理を行い, 続いて 1 時間ほど測定を行った。蒸散流量 (g/h) を求める計算式は,

$$F(\text{g/h}) = \frac{Q - \lambda A(\text{BH}-\text{AH})/\Delta X - k(\text{CH})}{C_w(\text{AH}+\text{BH})/2}$$

dT (°C) = AH, BH の差を温度に換算した値

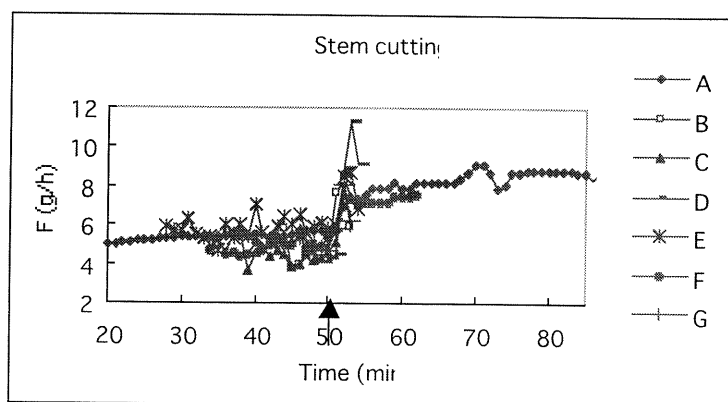
Q (W)=熱量 (蒸散流, 伝導, 対流等), λ (Wm⁻¹°C⁻¹)=茎の熱伝導率; 0.54 Wm⁻¹°C⁻¹,
 A (m²)=茎の横断面積, k (W/V)=ヒーター周囲に装着した熱流センサーの係数; $F=0$
になる時の値, AH, BH (mV)=ヒーター上下の起電力, CH =熱流センサーの起電力,
 ΔX (mm)=熱伝対間の距離, C_w =水の比熱; 4.18Jg⁻¹°C⁻¹

また,鋭利な切断が興奮状態を誘導しにくいことから, 同じ長さ (4~8cm) で同じ枚数の葉をつけたシュートを手で切断あるいはカミソリ (1 回使用済み) で切断し直ちに水にさし両処理区の 10 分間の水あげを比べた。

結果および考察》葉の切除, 茎の切断処理によって蒸散流量の上昇が確認された (図 1)。この結果は傷つけ後の dT (°C)と CH (mV)の低下が裏付けている (データ省略)。CH 値が再

び上がる（センサーに熱が溜まることで値としての F が高くなる）以前の傷つけ処理後また同じ時間の処理前の流量を求めた結果、傷つけ処理後の流量が処理前に比べ増加していることが確認された（表 1）。流量速度そして流量は、茎の切断処理が葉の切除処理より大きく増加した。また処理前の茎流速が速いほど傷つけ処理による流量の変化が大きくなる傾向を示した。これらの結果は、蒸散が多い日に、また茎の切断が葉の切除処理に比べ興奮状態指標が高かった前結果と一致した。カミソリによる鋭利な切断処理は手による切断処理に比べ単位時間あたりの水上げが高いことが示された（第 2 図）。この結果も興奮状態指標が高かった前結果と一致している。

蒸散量が傷つけによって一過的に上昇したことから 1. 興奮状態を誘導する物質的な移動、2. 傷刺激によって離れた上位の葉の浸透圧が上昇する結果として水あげを促した可能性が考えられる。水の移動（物質的移動）が褐色発生にどのように作用するかは不明だが、トマトなどの作物でも傷によって水の移動が促進される報告例は存在し、おそらく木部を通った情報の伝達があるものと思われる。*R. macrantha* は傷つけを受けた上位の葉のみに結晶をつくる性質がある。*Saintpaulia* は柵上細胞内にシュウ酸カルシウムの結晶がよく観察される。可能性として傷などの刺激によって可溶化された Ca が蒸散流に乗って運ばれたと思われる。*Saintpaulia* を用いて傷つけた 3 分後の葉の Ca 濃度を調べた結果、乾物中あたり 636ppm で健全葉 590ppm に比べ少し増加した傾向を示した(葉 10 枚の平均)。これに関してはさらなる調査が必要である。



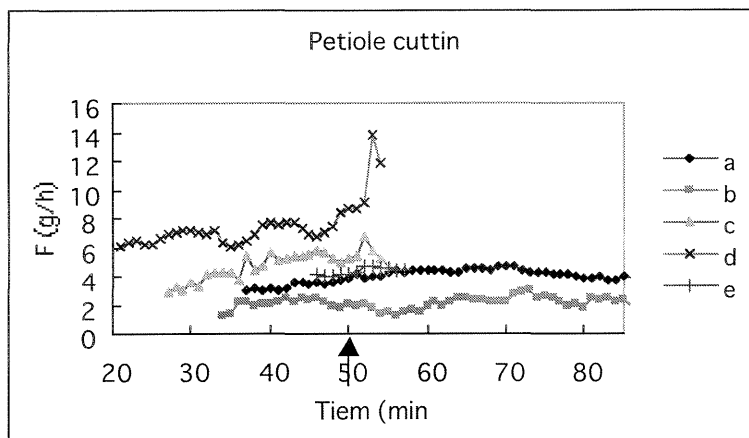


図1. *R.macrantha* の茎および葉柄の切断が蒸散流速に及ぼす影響

測定日は10/1-10/20中の晴れた日の10:00~3:00。

↑は切断開始を示す。

表1. *R.macrantha* の茎および葉柄の切断が単位蒸散流量に及ぼす影響

Time (min)	Stem cutting	
	Before (g)	After (g)
* 30	2.71	4.07
11	0.92	1.32
* 6	0.52	0.50
4	0.28	0.56
4	0.39	0.50
3	0.21	0.37
3	0.22	0.24
3	0.24	0.34

Time (min)	Petiole cutting	
	Before (g)	After (g)
30	1.02	1.06
15	0.82	1.00
11	1.07	1.17
6	0.43	0.46
5	0.44	0.46

*切り口を切断後直ちに水挿した。

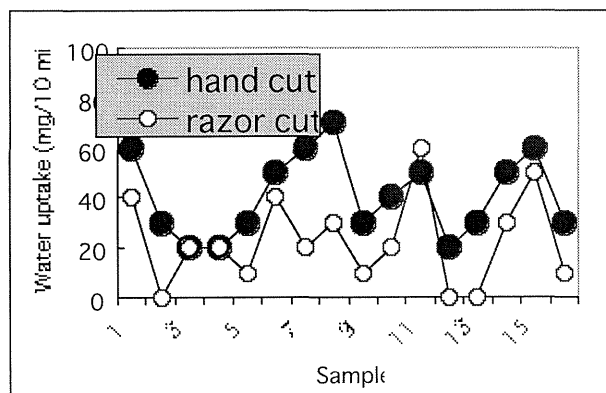


Fig. 2.. Effect of cutting severity on water uptake of cut shoot. Each opposite samples of hand cut and razor cut used in the experiment were the same length of shoots have same number of leaves.

実験 2. 傷つけ処理による葉のクロロフィル蛍光の変化

R. macrantha, *Saintpaulia* を用いて切葉部から上位の葉または葉の一部にパンチングを行い離れた健全部のクロロフィル蛍光 (Fv/Fm) を 1 分間隔で処理前後 10 分間測定を行った結果, 傷つけ処理による Fv/Fm の変化は認められなかった (データ省略)。無傷の葉また褐変を発生しない他植物においても有傷部から離れた健全部での Fv/Fm の変化はなかった。Fv/Fm は植物体が強光や低温などによるストレスを受けた際の光合成経路の損傷を表し, 興奮状態の葉は光合成活性に異常がないものと見られた。傷つけることで興奮状態を誘導した *Saintpaulia* に強光処理を行った結果, 無傷のものとは比べ葉焼けの程度に差がなかったことから, 興奮状態は褐変発生に対する感受性が高まっても他酸化的ストレスに対する感受性が高まった状態ではないと考えられた。

第6章 興奮状態の誘導機構と健全部で見られる細胞死の組織学的および生理学的な検討

研究の目的

イワタバコ科やキツネノマゴ科の植物の中には、組織の一部に傷つけることによって刺激部から離れた健全な葉が瞬時に褐変する植物が存在する。実際、これらの植物の栽培現場では、かん水や傷などを伴う作業の際に葉の褐変障害が問題となっている。一定の刺激を同じ植物に与えても障害が発生しやすい時と発生しにくい時が存在し、刺激に対する植物の感受性は非常に変動しやすいものである。この障害の主な特徴としては、1回目の傷刺激に対して褐変が発生しなくても、2回目の刺激に対して非常に敏感に褐変が発生する現象がある。我らはこの1回目の刺激を与えることで個体全体が過敏な状態となることを‘興奮状態’と名付けている。葉に急激な褐変障害を引き起こす植物の‘興奮状態’は、植物の刺激に対する感受性が局所的な傷刺激によって変化しやすいことを示している。障害発生の機構を解明するのにあたって‘興奮状態’を理解することは重要であると考えている。本実験は、興奮状態が誘導される条件を検討した上、興奮状態と障害発生との関係を明らかにし、最終的には興奮状態を制御することで障害発生を抑制することを目指している。なお、様々なストレスにより活性化される転写因子を多量に発現させた形質転換体（興奮状態が誘導されるセントポーリア）を用いた調査を行うことで、ストレス感受性と興奮状態との関連をも調査している。

研究実施項目とその内容

実験Ⅰ．健全部で見られる細胞死の組織学的および生理学的な検討

1. クロロフィル蛍光の変化を指標とした細胞死の検出
2. 障害葉の解剖核的観察
3. 刺激による組織レベルでの活性酸素の検出
4. TUNEL 法によるアポトシスの検出

実験Ⅱ．興奮状態の誘導機構の検討

1. 興奮状態の誘導条件
2. 興奮状態誘導への物質的な影響
 - 2-1. 褐変に対する感受性の異なる植物種間の接ぎ木を用いた実験
 - 2-2. 褐変に対する感受性の異なる植物種間の組織の汁液による興奮状態の誘導
 - 2-3. 組織の汁液による興奮状態の誘導系の確立

実験Ⅲ．興奮状態の生理学的検討

1. 刺激による葉内浸透圧の変化
2. フェノール酸化酵素活性の測定

研究の成果（結果）

実験 I. 細胞死の組織学的および生理学的検討

クロロフィル蛍光

方法) 実体蛍光顕微鏡下で健全な葉を固定し、葉の一部に傷つけ処理を行った時の葉のクロロフィル蛍光の変化を経時的にモニターした。

結果) ①葉の褐変部はクロロフィル蛍光が低下した部位と一致していた (図 1)。

②傷つけ約 3 秒後から障害部となる部分のクロロフィル蛍光が低下し始め、その後 20 - 30 秒にかけて蛍光が最低レベルまで低下した (図 2)。障害は不可逆的であった。これは離れた健全部で発生する葉の褐変が数秒単位で確認できる観察結果と一致していた。

③障害部はクロロフィルを持つ葉、包葉、がく片においても観察された。

障害の解剖学的観察

方法) 障害が発生してから数日経過した黄片部の樹脂切片を作成し、トルイジンブルーによる染色を行った後、光学顕微鏡下で検鏡を行った。

結果) 植物種や器官に関わらず全ての障害部 (図 3A) は葉緑体を多く含む柵状組織に限られた (図 3B)。しかし、障害程度が激しい時には柵状組織以下の海綿状組織の一部が障害を受けた。褐変した柵状細胞は数日かけて萎縮し、多くの場合その上に位置した表皮細胞は分裂し多層化した(データ省略)。

組織レベルでの活性酸素種の検出

興奮状態の誘導から傷害発生への活性酸素の関与を調べるため、組織レベルでの活性酸素の検出を試みた。

方法) DAB 1mg/ml の水溶液を鋭利に切断した *Streptocarpus holstii* の茎切断面から 1

日間吸わした後、傷刺激（切葉、茎の切断）を与え、上位の葉の DAB による染色を観察した。

結果）過酸化水素が発生した部位は褐色となるが、褐変した部位の色と分別が着かないため識別が不可能であった。活性酸素が障害部に限って発生するか、障害発生が進行する際に発生すものと考えられるが、この方法によっては分からなかった。他の組織抽出物を用いた活性酸素の検出方法でも有意な活性酸素の発生は認められなく、活性酸素の発生が障害発生の主要因とは考えにくい。健全部の葉またそれ以外の葉柄や茎では DAB による検出が認められなかった。

TUNEL 法によるアポトシスの検出

障害が積極的な細胞死であるかどうかを調べるため、アポトシスの検出を試みた。

方法）障害発生（＝傷つけ処理）からそれぞれ 1 分、30 分経過した *Saintpaulia* の葉の樹脂切片を作成した後、アポトシス *in situ* 検出キットを用いて細胞死の観察を行った。

結果）無処理の葉（健全葉）および陰性コントロールの葉が染色されてなかったのに対して、1 分、30 分経過した障害葉の葉緑体の全てが青く染色された（図 4）。葉の褐変は葉緑体の DNA の断片化を伴ったものと見られた。*Saintpaulia* の核は非常に小さく今回の観察結果では核の観察が困難であったため、核の大きい他の植物種を用いた観察がさらに必要である。

実験Ⅱ．興奮状態の誘導機構の検討

1. 刺激の伝達および興奮状態の誘導条件

以下の実験において“興奮状態の誘導”とは、予備実験の結果をもとに、刺激を与えた植物体を 1 - 2 分後常温の水に 3 秒間浸漬することで褐変が発生した時と見なした。

方法）温室で栽培している多数の障害の発生する植物種を用いて、温室内で調査した。

① 葉または茎の位置を変えて傷つけ処理を行い、興奮状態が誘導される葉の位置を調査した。

② 興奮状態が誘導されやすい時間帯、天候などを調査した。

結果) 興奮状態の誘導(刺激の伝達)は、

① 傷つけ部位に関わらず、幼葉の方が成葉と老葉に比べ誘導されやすい。

② 刺激の上位に位置した葉のみで見られる。葉序が対生である植物種では刺激部と同じ位置に着いた葉のみで見られる。

③ 刺激部からの距離が近いほど誘導されやすい(図5)といった特徴を示した。

④ 興奮状態は、晴天日が曇りや雨天日に比べ、また昼が夜の時間帯に比べ誘導されやすかった(図6)。

2. 刺激伝達への物質的な影響

2-1. 接ぎ木した植物を用いた実験

一部への刺激により離れた健全部が興奮状態となるためには、与える刺激が傷を伴う必要がある。そして、興奮状態が蒸散の盛んな時に誘導されることと刺激部から上位の葉のみに誘導されることは、蒸散による物質的な移動があるものと考えられる。

方法) *Ruellia* 属の褐変しやすい種 (*R. macrantha*; Rm) および褐変しにくい種 (*R. barbielana*; Rb, *R. humilis*; Rh) を図7のような組み合わせで接ぎ木を行った。穂木の葉が2枚以上展開したときに、台木の茎を切断あるいは台木の葉を切断し、穂木の興奮状態の確認およびその時の褐変程度を対照区(穂木の株)のそれと比較した。

結果) 台木が Rm の場合は、台木に傷つけ処理をした際、本来褐変しにくい穂木 Rb や Rh において興奮状態を誘導する(褐変)ことが可能であった(図7、表1)。逆に、台木が Rb や Rh である場合、台木への傷つけによって穂木 Rm の褐変程度を抑える傾向が見られた。以上の結果から、褐変する植物種特有の物質が維管束を通過して上位に移動され、興奮状態が誘導されるものと考えられた。

2-2. 異なる種間の組織の汁液による興奮状態の誘導

方法) 傷物質の影響を最小限にする目的で、カミソリを用いて鋭利に切断した(シュートの興奮状態がほとんど見られない)後→褐変する種としない種の汁液(若い茎や葉の摩砕液 1/10-1/1000(w/w)倍)を用いて表2の組み合わせで、切り口に3秒間つけ→処理したシュートを2分間室内で放置→興奮状態の誘導を確認した。興奮状態がよく誘導される日(晴天の午前11:00-12:00)に実験を行った。

結果) 褐変する植物の汁液を他褐変する植物種に処理することによって(科が異なっても)興奮状態が誘導されることが確認された(表2)。直接傷によって誘導された褐変より程度は少なかったが、水のみをつけた(対照区)シュートに比べると著しく褐変を誘導した。褐変しない植物種の汁液は褐変を誘導する効果はなく、また全く褐変しない種には褐変する植物の汁液を処理しても褐変することはなかった。この結果は、接ぎ木を用いた実験結果と一致しており、褐変する植物では褐変を誘導する特有の物質が存在し、それによって興奮状態が誘導されるものと考えられた。

2-3. 組織の汁液を用いた興奮状態の誘導系

方法) 砂入りの蒸留水で摩砕した組織の汁液(1/10-1/1000(w/w)倍)にリーフディスクを入れ、常温で30分間振とうした後リーフディスクに傷つけ処理を行った。障害の発生する種としない種間での影響を調べた。

結果) 2-2での結果と同様、障害の発生する植物種の汁液は障害の発生する植物種の興奮状態を誘導し、傷つけによって褐変が発生した。蒸留水で振とうしたリーフディスク(対処区)は傷つけ処理によって褐変発生が見られなかった。障害が発生しない種の汁液は障害が発生する種の興奮状態を誘導しなかった。この方法は興奮状態の誘導する植物種をスクリーニングする方法として利用できると考えられる。今後、この簡易方法を用いて興奮状態を誘導する植物種特異の物質についてさらに検討する予定である。

実験Ⅲ. 興奮状態の生理学的検討

刺激による葉内浸透圧の変化

方法) 生育温度 18-26°Cの温室内で生育したセントポーリア‘リタリ’の成株を供試した。室温約 21°Cの実験室に持ち込み、数時間底面かん水した植物体の葉からリーフディスクを採取した。生検トレパンを用いてリーフディスク(直径 0.8mm)を切り取り、異なる水温の蒸留水に 30 分間リーフディスクを浸漬した。処理前後の新鮮重から吸水あるいは脱水量を求めた。組織の浸透圧は、3ml のマンニトール液(0-0.2M の 6 段階)に 1 時間リーフディスクを浸漬した後、処理前後の新鮮重の差から吸水あるいは脱水量を求めた。値が 0 となる際のマンニトールのモル濃度を Mpa に換算し、この値を組織の浸透圧とした。マンニトール液 0-0.2M は浸透圧 0~0.5MPa に相当する。

興奮状態を誘導する 1 次刺激処理としては、35°Cの水に葉を浸漬する処理と一部の葉を切り取る処理とした。

1 次刺激処理を行った後、浸透圧を調べた。リーフディスクは 1 枚の展開葉から 2 つずつ採取した。水浸漬処理したリーフディスクはキムワイプで水分を素早く除去した後新鮮重を測定した。

通常の状態→興奮状態→葉の褐変発生

↑ ↑

1 次刺激 2 次刺激

葉の褐変発生までに予想される過程

結果) 高温の水に浸漬したリーフディスクは低温の水に浸漬したものに比べ単位時間当たりの吸水量が多くなった(図 8)。高温になるほど速く吸水する傾向を示した(データ省略)。15°Cではリーフディスクからの脱水が見られた。異なる水温の水にリーフディスクを 1 分間浸漬した結果、35°C処理で 21°C処理のものに比べ約 1.3 倍高い浸透圧を示した(表 3)。また、切り取った葉または数枚の葉を切り取った植物体に付いている健全葉は、それぞれ無傷の葉に比べ約 2 倍、1.4 倍高い浸透圧を示した(表 3)。興奮状態を誘導する高温の水へ葉を浸漬する処理(葉温の上昇)と葉の切除処理は、葉内への吸水を促進することが示唆された。水との接触または傷によって急激に発生

する葉の褐変には、組織の浸透圧の変化を伴う水の移動が関係している可能性が示唆された。

2. フェノール酸化酵素活性の測定

障害の発生する植物種は、実験Ⅱの結果のような葉齢や天候の影響だけでなく生育環境によっても褐変発生の程度に大きな差異が見られる。褐変は組織内のフェノールの酸化によるものであり、葉緑体内に存在する Polyphenol oxidase(PPOs)の酵素活性の違いは褐変発生の程度に関わっている。

方法) 褐変傷害が発生する植物種と発生しない種の PPO 活性を調べた。また、興奮状態を誘導する傷つけ処理および高温処理による PPO 活性の変化を調べた。PPO 活性は (1Unit=1A₄₉₀min⁻¹mgProtein)、葉をリン酸バッファで抽出、遠心した上澄みを基質である DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine)と反応させた時の吸光度 (△490nm) を分光光度計により測定した。

結果) 褐変障害が発生する植物種と発生しない植物種間における PPO 活性の関係は見られなかった (表4)。しかし、障害の発生するセントポーリアを用いた傷つけ (葉の切除後1分経過) と 35℃ (1分間植物体を浸漬) の高温処理は、対照区に比べそれぞれ約3倍と5倍の高い PPO 活性を示した (表5)。興奮状態を誘導する刺激の処理は、葉の PPO 活性を高めることで褐変障害を招くものと見られた。

表2 組織の汁液（褐変障害の感受性が異なる植物種）の処理による興奮状態誘導の有無

汁液に用いた植物種	汁液を処理した植物種					
	<i>S.ionantha</i>	<i>S.holstii</i>	<i>R.macrantha</i>	<i>E.pulchellum</i>	<i>R.barbielana</i>	<i>S.cusia</i>
<i>Saintpaulia ionantha</i> (Gesneriaceae)	○	○	○	×	×	×
<i>Streptocarpus holstii</i> (Gesneriaceae)	○	○	○	×	×	×
<i>Ruellia macrantha</i> (Acanthaceae)	○	○	○	×	×	×
<i>Eranthemum pulchellum</i> (Acanthaceae)	×	×	×	×	×	×
<i>Ruellia barbielana</i> (Acanthaceae)	×	×	×	×	×	×
<i>Strobilanthes cusia</i> (Acanthaceae)	×	×	×	×	×	×

^s 興奮状態が誘導される植物種

ⁱ 興奮状態が誘導されない植物種

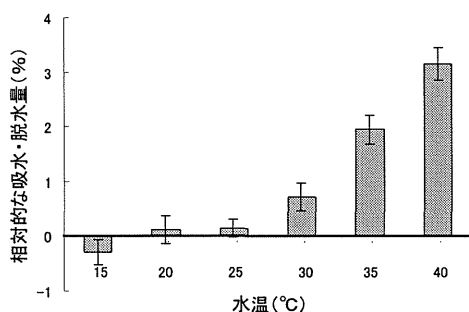


図8 水温の違いがリーフディスクの吸水と脱水に及ぼす影響

² (処理後の新鮮重 - 処理前の新鮮重) / (処理前の新鮮重) × 100. 図中のバーは SE (n=24).

表3 興奮状態の誘導処理（1次刺激）がリーフディスクの浸透圧に及ぼす影響

興奮状態の誘導処理		浸透圧 (MPa)
温度別の水に浸漬処理	35°Cの水に1分間浸漬	0.25 ± 0.003 ^z
	21°Cの水に1分間浸漬	0.19 ± 0.007
葉の切除処理	切除葉	0.20 ± 0.009
	無傷株の葉(対照区)	0.10 ± 0.011
	葉を切除した株の健全葉	0.22 ± 0.009
	無傷株の葉(対照区)	0.15 ± 0.006

^z 平均値 ± SE (n=12).

表4 褐変障害が発生する種と発生しない種における PPO 活性

PPO活性(A490min-1mgProtein)		
褐変する種	<i>Saintpaulia</i> 'Ritali'	0.17
	<i>Streptocarpus holstii</i>	1.57
褐変しない種	<i>Chirita</i> spp.	1.45
	<i>Fittonia</i> spp.	0.3

3回反復の平均値

表5 セントポーリアを用いた興奮状態の誘導刺激による PPO 活性の変化

PPO活性(A490min-1mgProtein)	
刺激前	0.15
刺激後(傷つけ処理)	0.5
刺激後(高温処理)	0.89

3回反復の平均値

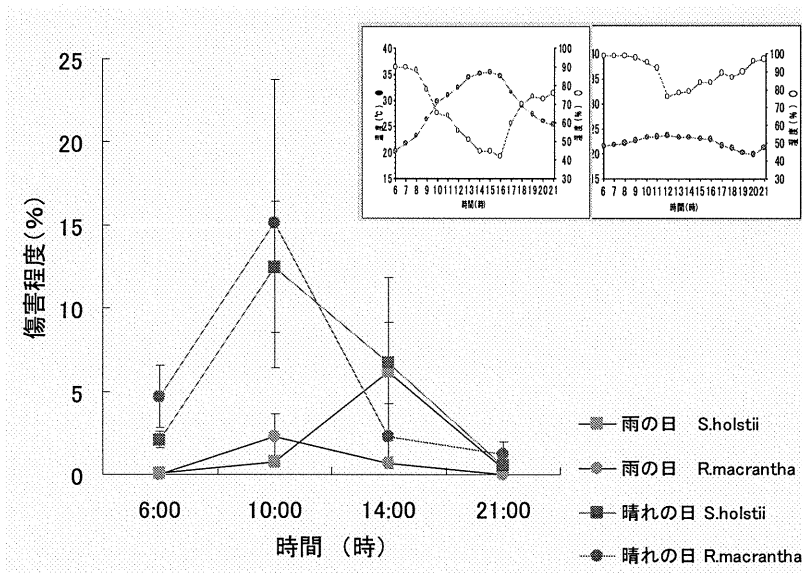


図6 天候と一日の時間帯による興奮状態の誘導の違い

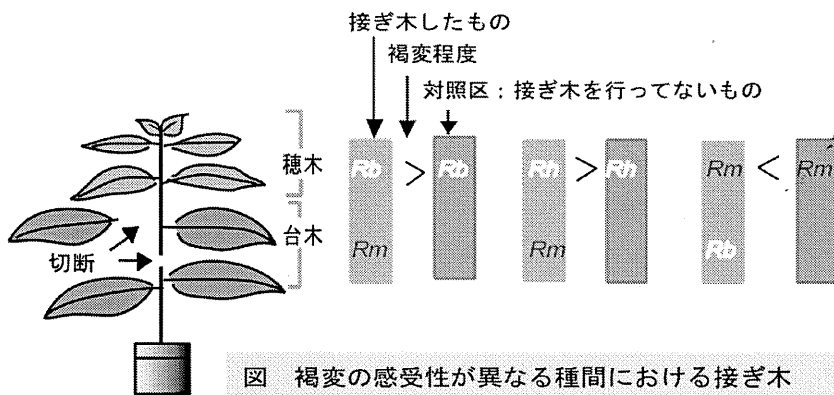


図 褐変の感受性が異なる種間における接ぎ木

図7 褐変障害の感受性の異なる *Ruellia* 種間における接木と切断刺激による興奮状態の誘導

表1 褐変障害の感受性の異なる *Ruellia* 種間の接木と切断刺激による褐変障害の程度

穂木/台木	Rb/Rm	Rb 対照区	Rh/Rm	Rh 対照区	Rm/Rb	Rm/Rh	Rm 対照区
障害程度 ^z	1.5	0	1.7	0.5	1	1	2.7
親和性	15/20	10	10/150	10	3/20	2/20	10

^z 障害程度は、0から3までの4段階評価で表した

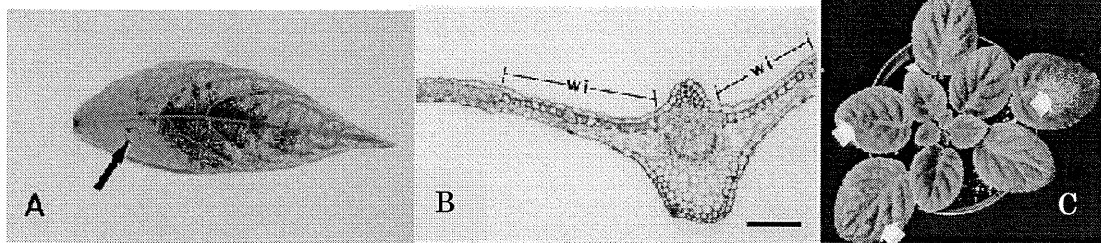


Fig. 3. Leaf injury induced by a local wound.

A, Leaf browning induced at sites distant from the wound by crushing with a leaf puncher (black arrow) in detached leaf in *Ruellia macrantha*

B, Leaf transverse section 7 days after wounding, indicates injury of palisade layer (wi). Bar = 200 μ m.

C, Injury of young leaves induced by excision (detachment) of old leaves in *Saintpaulia ionantha* cv. Akira. More than five basal leaves were detached at once on a sunny day in a glasshouse. The photograph was taken more than a week after the treatment.

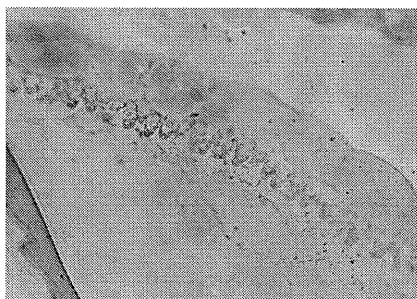


図4 TUNEL 法によるセントポーリア葉のアポトシスの検出 (青色に染色された柵状細胞)

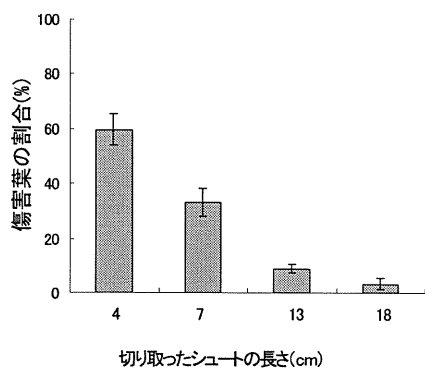


図5 切り取った *Streptocarpus saxorum* シュートの長さ と 傷害葉の割合 と の 関 係

切り取った部位の距離が長くなるほど葉(先端部の幼葉)の興奮状態はほとんど誘導されなくなる。

バーはシュート 10 個体の平均 \pm SE

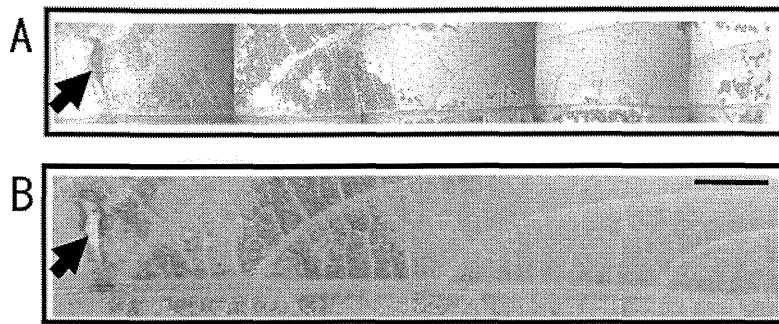


Fig.1. The distribution of injury in a leaf after wounding at a distant site in *Ruellia macrantha*. A, Chlorophyll fluorescence image of leaf injury. The images were captured within 1 min after wounding. Black image shows the decline of fluorescence intensity (injury); B, The same part of the leaf with A was photographed 1 hr after wounding. The arrow indicates wounded site (1-cm length). Bar = 1 cm.

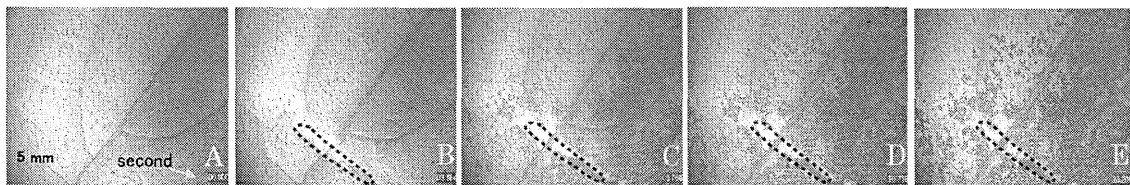


図2 切断（傷つけ処理1分前）した *Ruellia macrantha* の葉（向軸側）に傷つける（点線、約1cm）ことによって見られるクロロフィル蛍光強度の低下 A. 傷つける直前；B, C, D, Eは、それぞれ傷つけてから0（傷つけた直後）、3、7、25秒後の様子 傷害部（褐変）は暗く（低い蛍光強度）、健全部は明るく（高い蛍光強度）写っている。