キャベツ内部黒変症状と細胞死の関係

飯塚正英*・瀬山祥平・鈴木 修・小泉丈晴

群馬県農業技術センター 379-2224 群馬県伊勢崎市西小保方町

Relationship between Internal Black Spot of Cabbage and Cell Death

Masahide Iizuka*, Shohei Seyama, Osamu Suzuki and Takeharu Koizumi

Gunma Agricultural Technology Center, Nishi-obokatamachi, Isesaki, Gunma 379-2224

Abstract

The cause of internal black spot of cabbage has been speculated to be cold damage. However, in this study, we hypothesized that an acute temperature increase in the cabbage head can also be a cause, and conducted a detailed analysis on temperature change inside the cabbage head leaves and the effect of the formation of ice. Inside the cabbage leaves in winter, water droplets often froze and formed ice. Under sunny conditions, the temperature inside the cabbage leaves rose very quickly, and cell death occurred. When ice formation was induced at -5°C , cell death was induced within 60 min in all tested samples. Cell death was confirmed by tripan blue staining. Thus, we concluded that rapid thawing of frozen leaves by an acute temperature increase inside cabbage head leaves can cause damage to the cells, resulting in internal black spot.

Key Words : cold injury, ice inoculation, necrotic cell, rapid thawing

キーワード : 壊死, 急速融解, 植氷, 凍害

緒 言

冬季に栽培されるキャベツでは低温による寒害が発生し、出荷量の減少を招いている。結球期における寒害には2つの症状が存在する(飯塚ら, 2009)。1つは結球葉の外葉が壊死する症状(外葉壊死), もう1つが内部黒変症状である。外葉壊死症状は結球外葉が広く壊死し、腐敗する症状であり(第1図A), 凍結が原因で後に腐敗病を発生させる(青柳ら, 1991; 五十嵐・大林, 1985)。一方, 内部黒変症状は, 外観上は障害がみられないが, 結球葉を3~4枚剥いだ内葉部分に, 黒色の斑点が生じる(第1図B)。内部黒変症状では収穫時に外観から発生が確認できないため, 選別が困難であり, 流通後に発覚する場合が多く問題になっているが, 原因は不明で有効な対策はとられていない。

キャベツは低温順化によって耐凍性を獲得し(Cox・Levitt, 1969; Kohn・Levitt, 1965), 氷点下の温度にも耐えうる植物である。しかし, 脱順化によって速やかに耐凍性を消失する(Sasakiら, 2001)。一般に生物は氷点下でも凍結しない過冷却状態を維持する(酒井, 1982)とされ, 過冷却と凍結の関係も報告されている(Rajashekarら, 1983)。北浦(1967)は過冷却中の桑葉に植氷すると直ちに過冷却

が破壊され, 葉内が凍結することから, 降霜または結露の凍結が葉の凍結を引き起こすとしている。冬季キャベツ結球内空隙に水滴が存在する時, 低温により水滴は凍結すると予想される。また, 内部黒変症状が結球葉の内層で発症する(飯塚ら, 2009)ことから, 結球内空隙の温度環境も影響している可能性がある。そこで本報では, 不明とされている内部黒変症状の発生環境を明らかにするため, 冬季ほ場のキャベツ結球内空隙部の観察と植氷による斑点形成条件の検討を行い, 結球内空隙に生じる水滴の凍結とキャベツ葉の壊死との関係について究明しようとした。

材料および方法

1. 内部黒変症状発生個体の観察

2008年8月15日にキャベツ品種‘あさしお’を播種し, 群馬県農業技術センター内のほ場で生育させた。栽植密度は 60×40 cm(畦幅 × 株間)で, 施肥は成分で $\text{N} : \text{P}_2\text{O}_5 : \text{K}_2\text{O} = 20 : 24 : 20$ kg/10 aを施用した。2009年2月3日午前9時に結球した5個体(平均結球重1,132 kg)の外葉を剥ぎ, 内部の様子を観察した。観察時の天候は晴, 気温 -1.3°C , 湿度55%RHであった。

2. キャベツ結球内部の温度変化

2009年8月2日にキャベツ品種‘あさしお’を播種し, 群馬県農業技術センター内のほ場で生育させた。栽植密度は 60×40 cm(畦幅 × 株間)で, 施肥は成分で $\text{N} : \text{P}_2\text{O}_5 : \text{K}_2\text{O} = 20 : 24 : 20$ kg/10 aを施用した。2010年1月9日と1月12

2012年4月5日 受付。2012年9月18日 受理。

本報告の一部は平成21年度園芸学会春季大会において発表した。

* Corresponding author. E-mail: i-masa@pref.gunma.lg.jp

日に、結球した1個体（結球重1,788 kg）の表面と、表面から3枚目と4枚目の空隙、6枚目と7枚目の空隙、10枚目と11枚目の空隙の温度を測定した。空隙の温度は直径2 mmの針金を用いて導入穴を開け、温度記録計（TR-52, ティアンドデイ）のセンサー部分を挿入し、1時間ごとの温度変化を記録した。センサー到達点は調査後にキャベツを切断して確認した。

3. 植氷がキャベツ葉の斑点形成に及ぼす影響

供試材料としてキャベツ品種‘あさしお’を用いた。2009年9月28日に播種し、4週間後に直径9 cmのポリポットに移植して生育させ、草丈12～14 cm、葉数5～7枚の幼苗を用いた。11月30日から7日間5°C、8,000 lx、12時間日長のグロースチャンバーで低温順化处理した後、北浦（1967）の方法に準じて葉面にスプレーで水滴を散布し、-5°Cの低温室に入れて植氷した植氷処理区と植氷せずに-5°Cの低温室に入れた無処理区とで斑点形成に及ぼす影響を比較した。調査方法はそれぞれ10株ずつ15分、30分、45分および60分後に低温室から取り出して、20°C、8,000 lx、12時間日長のグロースチャンバーで3日間処理して葉上の斑点形成を観察した。また、植氷処理後の温度条件が斑点形成に及ぼす影響について、20°Cで3日間処理したものを急速融解区、5°C 60分の後20°Cで3日間処理したものを5°C→20°C区、0°C 60分の後20°Cで3日間処理したものを0°C→20°C区、0°C 60分の後、5°Cで60分、さらに20°Cで3日間経過したものを緩融解区とし、それぞれ10株を12時間日長のグロースチャンバーで処理して葉上の斑点形成を観察した。斑点は、形成程度により0～3の指数で分類され、1葉中の形成度により評価した。斑点形成度 = Σ （指数×株数）／3×調査株数。指数は0：斑点なし、1：斑点形成数少（斑点が1/3以下の面積で認められる）、2：斑

点形成数中（斑点が1/3～2/3の面積で認められる）、3：斑点形成数多（ほぼ全葉で斑点形成が認められる）とした。

4. 植氷による細胞死の再現

供試材料としてキャベツ品種‘あさしお’を用いた。2011年3月2日に播種し、草丈12～14 cm、葉数5～7枚の幼苗5株ならびに2011年8月2日に播種し、翌年1月11日までほ場で生育させた結球株（結球重1,654 kg）の外葉から3枚目を用いた。幼苗は、播種4週間後に直径9 cmのポリポットに移植して生育させ、5月9日から7日間5°C、12時間日長のグロースチャンバーで低温順化处理した。幼苗の植氷方法は葉面にスプレーで水滴を散布し、-5°Cの低温室に入れた。植氷処理した幼苗を45分後に取り出して、20°Cのグロースチャンバーで24時間処理した。1株から2枚の葉を用いてKoch・Slusarenko（1990）に従ってトリパンブルー染色を行い、細胞死を確認した。すなわち、約2×2 cmに切り抜いた葉をラクトフェノールトリパンブルー溶液（乳酸10 mL、グリセロール10 mL、フェノール10 mL、トリパンブルー10 mg）で染色した後、クロールアルハイドレート溶液（クロールアルハイドレート25 g、蒸留水10 mL）で洗浄し、実体顕微鏡（SZH10, オリンパス）で観察した。

結 果

1. 内部黒変症状発生個体の観察

5個体すべての個体で、結球内部の葉面に多数の水塊が認められた。水塊と水滴が混在している部分もあり、葉面には変色した痕も認められた（第2図）。5個体中2個体で内部黒変症状が発生していた（第3図）。

2. キャベツ結球内部の温度変化

2010年1月9日の観察地は晴天でキャベツ近傍の雰囲気

第1図 冬季栽培キャベツにおける寒害症状

A：外葉壊死症状

B：内部黒変症状

2009年1月13日、群馬県農業技術センターほ場で撮影
品種は‘あさしお’

第2図 キャベツ結球葉内部の水結

W : 水滴, I : 氷塊, T : 変色痕

2009年2月3日, 群馬県農業技術センターほ場で撮影
品種は 'あさしお'

第3図 キャベツ結球葉内部の黒変症状

第4図 晴天時のキャベツ結球内部の温度変化 (2010年1月9日)

3-4 : 3枚目と4枚目の空隙

6-7 : 6枚目と7枚目の空隙

10-11 : 10枚目と11枚目の空隙

第5図 曇天時のキャベツ結球内部の温度変化 (2010年1月12日)

3-4 : 3枚目と4枚目の空隙

6-7 : 6枚目と7枚目の空隙

10-11 : 10枚目と11枚目の空隙

第6図 植氷によるキャベツ幼葉上の斑点形成

-5°Cで植氷処理60分後に20°C3日処理したキャベツ幼葉
バーは1cm

温度は最低温度は-4.8°C, 最高温度は13.5°Cであった。キャベツ結球内部の温度変化を第4図に示す。2010年1月12日の観察地は曇りでキャベツ近傍の雰囲気温度は最低温度は-3.3°C, 最高温度は3.6°Cであった。キャベツ結球内部の温度変化を第5図に示す。

3. 植氷がキャベツ葉の斑点形成に及ぼす影響

植氷の有無がキャベツ葉の斑点形成に及ぼす影響を調べたところ, 植氷処理時間が15分区分は斑点形成指数が23.3, 30分区分では30, 45分区分では43.3, 60分区分では93.3であった。植氷無しでは-5°C, 60分の低温処理でも斑点形成は認められなかった(第1表)。植氷処理60分後に20°Cに移行した区の斑点形成を第6図に示す。また, 植氷後の解

第1表 植氷がキャベツ葉の斑点形成に及ぼす影響

処理区	斑点形成度 ^z			
	15分 ^y	30分	45分	60分
植氷	23.3	30	43.3	93.3
無処理	0	0	0	0

^z: 斑点形成度 = Σ (指数 × 株数) / 3 × 調査株数

^y: -5°C 処理時間

供試品種は 'あさしお'

数字は斑点の形成程度を指数で表し, 0 は斑点なし, 1 は斑点が 1/3 以下の面積で認められ, 2 は斑点が 1/3 ~ 2/3 の面積で認められ, 3 はほぼ全葉で斑点形成が認められる

第2表 融解温度がキャベツ葉の斑点形成に及ぼす影響

処理区 ^z	斑点形成度 ^y
0°C 60分 → 5°C 60分 → 20°C ^x (緩融解)	0
0°C 60分 → 20°C	6.7
5°C 60分 → 20°C	33.3
20°C (急速融解)	93.3

^z: 植氷後 -5°C で 60 分凍結処理した後の融解条件

^y: 斑点形成度 = Σ (指数 × 株数) / 3 × 調査株数

^x: 20°C で 3 日間処理

供試品種は 'あさしお'

数字は斑点の形成程度を指数で表し, 0 は斑点なし, 1 は斑点が 1/3 以下の面積で認められ, 2 は斑点が 1/3 ~ 2/3 の面積で認められ, 3 はほぼ全葉で斑点形成が認められる

凍時間が葉の斑点形成に及ぼす影響を調べたところ, 急速融解区では葉に斑点が形成されたが, 緩融解区では葉に斑点形成は認められなかった (第2表).

4. 植氷による細胞死の再現

植氷処理をした幼苗の葉 10 枚のうち 9 枚でトリパンブルー染色により染色部位が認められ (第7図 A), 水滴を散布した位置と類似していた. 一方, 植氷処理をしない幼苗の葉はすべてで染色部位が認められなかった (第7図 B). また, ほ場で栽培したキャベツ葉でも染色部位が認められた (第7図 C, D).

考 察

冬季に生存できる植物の凍結は細胞外凍結と考えられる (酒井, 1982). 細胞外凍結では細胞間隙に氷晶が形成され, 細胞内の水は細胞間隙の氷に移動し脱水される. その結果, 細胞内溶液は濃縮され凍結は阻止される (Asahina, 1956). やがて融解が起こると細胞に水分が戻り復元する. しかし脱水により障害が引き起こされることもある (Sukumaran・Weiser, 1972; Pearce, 2001). また, 脱水による障害が起こらないときでも, 融解速度が速いとき障害が起こる (吉田・酒井, 1967). Laurie・Palta (1991) は日射による急激な融解が細胞を損傷させることを報告している. 本試験では曇

第7図 トリパンブルー染色によるキャベツ葉の細胞死の確認

A: 植氷有 (幼苗), B: 植氷無 (幼苗), C: ほ場結球葉, D: 同左拡大
バーは 5 mm

天日のキャベツ結球内の温度変化はほとんどみられなかったが、晴天日は温度上昇がみられた（第4, 5図）。晴天日の7～9時までの2時間の温度上昇は表面で14.1°C, 3枚目と4枚目の空隙で21.8°C, 10枚目と11枚目の空隙で14.6°C上昇し、特に3枚目と4枚目の空隙の温度上昇が著しく、氷の急激な融解が起こりやすい環境である。また、晴天時のキャベツでも日陰面では温度上昇がみられなかった（データ省略）。このことは内部黒変症状が結球葉3～4枚目に多発し、しかも局所的に症状が現れることと関連があると考えられる。結球内空隙では水滴の凍結が観察され、観察中に変色痕がみられた（第2図）。これは北浦（1967）が桑で報告したようにキャベツ葉面の水滴が凍結し、その直下で過冷却が破壊され葉の凍結が起こっていたためと思われる。キャベツ幼苗に水滴を散布し、-5°Cで60分（植水処理）後に20°Cで加温するとほぼ全葉で斑点が形成され、植水しない区では斑点が形成されなかった（第1表）。さらに、植水しても融解速度の違いで斑点形成に差があり、-5°Cから20°Cに加温した急速融解区では斑点が現れ、緩融解区では斑点は形成されなかった。このことは植水により葉表面の水塊と接する葉内の過冷却が破壊され、斑点状に凍結したためと思われる。キャベツ結球内で観察された変色痕も凍結痕と考えられる。そして、-5°Cから20°Cに加温すると急激な融解が起こり、細胞を損傷させるが、0°C付近で緩やかに融解すると細胞は損傷することなく、元の状態に復元される。冬季は場での観察により、キャベツ結球葉では水滴による凍結は広範囲で起こっているが、急激な融解は晴天時の日射部分で起こるため、内部黒変症状が局所的に発症すると考えられる。実際の内部黒変症状の斑点は暗茶色から黒色を示すことが多いが、幼苗を用いたポット試験では、白色系の斑点が形成された。Cox・Levitt（1976）はポット試験とフィールドでは結果が異なる場合があると指摘しており、結球葉と幼苗の葉の生育ステージや温度条件が影響した可能性が考えられる。本試験では脱順化の影響を検討していないが、佐々木ら（2002）は日射により葉温が上昇し、脱順化を引き起こしていると報告しており、脱順化の影響も考慮する必要がある。

急速な融解により細胞死が起きている可能性をトリパンブルー染色法（Koch・Slusarenko, 1990）により死細胞を染色して確認したところ、植水し急速融解したキャベツ幼苗は斑点状に染色された細胞が存在し（第7図A）、死細胞が確認された。また、は場の結球しているキャベツについて、肉眼では斑点が判別できない部位を同法で染色したところ、斑点状に死細胞が判別できた（第7図C, D）。以上のことから結球内空隙の水滴の凍結と急速融解は死細胞発生の原因となることが明らかになった。そして、キャベツ内部黒変症状はこの現象による死細胞が痕跡となり斑点状に症状が現れると推察される。このように内部黒変症状が水滴の凍結と結球内の急激な温度上昇が連動して引き起これるとするなら、その条件を緩和することで今後、内部黒

変症状の発生を抑制し、具体的な対策を実施することが可能と考えられる。

摘 要

寒害と思われるキャベツ内部黒変症状の発生原因究明を目的に、内部黒変症状発生個体の観察、キャベツ結球内部の温度変化、植水がキャベツ葉の斑点形成に及ぼす影響について検討した。冬季のキャベツ結球内空隙では水滴の凍結が観察された。結球内空隙では晴天時に急激な温度上昇がみられた。キャベツ葉を-5°Cで植水すると60分ではほぼ全葉で斑点形成が認められた。凍結後、-5°Cから20°Cの環境に移したところ、死細胞の発生が認められた。急激な融解が細胞を損傷させたものと考えられた。このことから、結球内空隙の水滴の凍結と急速融解は死細胞発生の原因となることが明らかになり、キャベツ内部黒変症状はこの現象による死細胞発生と関連があることが示唆された。

引用文献

- 青柳森一・神保信幸・所 重雄・村井正和. 1991. 冬春キャベツの寒害防止に関する研究, 第1報産地における寒害の発生実態とその発生条件の解明. 千葉農試研報. 32: 19–29.
- Asahina, E. 1956. The freezing process of plant cell. Contrib. Inst. Low Temp. Sci. 10: 83–126.
- Cox, W. and J. Levitt. 1969. Direct relation between growth and frosthardenening in cabbage leaves. Plant Physiol. 44: 923–928.
- Cox, W. and J. Levitt. 1976. Interrelations between environmental factors and freezing resistance of cabbage leaves. Plant Physiol. 57: 553–555.
- 五十嵐大造・大林延夫. 1985. 夏まき冬どりキャベツの凍害と腐敗病の関係について. 神奈川園試研報. 32: 35–41.
- 飯塚正英・村永順一郎・金井幸男. 2009. 冬どりキャベツにおける凍害発生の品種間差. 園学研. 8 (別2): 509.
- 北浦 澄. 1967. 晩霜による桑の凍結および被害に関する研究. 蚕試報. 22: 207–327.
- Koch, E. and A. Slusarenko. 1990. Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. Plant Cell 2: 437–445.
- Kohn, H. and J. Levitt. 1965. Frost hardiness studies on cabbage grown under controlled conditions. Plant Physiol. 40: 476–480.
- Laurie S. W. and J. P. Palta. 1991. Influence of thaw rates on the level of injury by freeze-thaw stress in a cold hardy potato species. HortScience 26. 6: 732–733.
- Pearce, R. S. 2001. Plant freezing and damage. Ann. Bot. 87: 417–424.
- Rajashekar, C. B., P. H. Li and J. V. Carter. 1983. Frost injury and heterogeneous ice nucleation in leaves of tuber-bearing

- solanum species ice nucleation activity of external source of nucleants. *Plant Physiol.* 71: 749–755.
- 酒井 昭. 1982. 植物の耐凍性と寒冷適応. 学会出版センター. 東京.
- Sasaki, H., K. Ichimura, S. Imada and M. Oda. 2001. Loss of freezing tolerance associated with decrease in sugar concentrations by short-term deacclimation in cabbage seedlings. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70: 294–298.
- 佐々木英和・今田成雄・小田雅行. 2002. 遮光処理によるキャベツの葉温低下と脱順化の抑制. *園学研.* 1: 133–136.
- Sukumaran, N. P. and C. J. Weiser. 1972. Freezing injury in potato leaves. *Plant Physiol.* 50: 564–567.
- 吉田静夫・酒井 昭. 1967. 植物の凍害におよぼす融解速度の影響. *低温科学. 生物篇.* 25: 71–79.