水稻幼植物の低温障害に関する研究

第2報 葉色の低温による変色、常温における回復と 色素組成との関係、ならびにその品種間差*

佐 藤 庚・朴 慶 培

(東北大学農学部)

昭和56年1月31日受理

可視部の光を吸収する色素は多種類存在するが、葉緑体に存在し、光合成反応に必要な光エネルギーを吸収する色素、すなわち光合成色素の種類は少なく、化学構造から次の3グループに大別される。第1はクロロフィル、第2はカロチノイドで、これらはすべての光合成生物に存在する。第3はフィコビリリンで、前二者に比べて、限られた光合成生物にしか存在しないという¹⁾。クロロフィルは a, b, カロチノイドには β -カロチン, ルテイン, ビオラキサンチン, ネオキサンチンがあり、クロロフィルは可視部のうち、青色部(〜400 nm)と、赤色部(650〜700 nm)をよく吸収し、カロチノイドは 400〜500 nm の光を吸収するとされている^{11,12)}。佐藤・朴¹⁰⁾は水稻の葉色は低温にあると低温の程度によって緑色から黄色ないし褐色に変色すると報告した。しかし、低温による水稻の葉色の变化を光合成色素の組成から検討した成績は見当たらない。著者らは、苗代期の圃場で観察される低温による葉の変色、温度上昇に伴う葉色の回復の両過程を、ファイトトロンを利用して、実験的に再現し、この両過程を色素組成の変化から明らかにしようとした。

実験材料および方法

供試品種は日本型稲のササニシキ、印度型稲の IR 24 および日印交雑稲の Milyang No. 23 である。常温(昼/夜温 25°/20°C)のファイトトロン内にて、自然光下で発芽後13日間生育させ、苗齢が約4.0に達した時に、常温区は 25°/20°C でさらに14日間処理し、低温区は 17°/12°C で7日および14日間処理した。低温7日処理区は処理終了後常温(25°/20°C)にもどし、7日間生育させて葉色の回復過程をしらべた。全生葉の葉身 0.5 g を細切して 80% アセトン溶液で抽出し、MCKINNEY-ARNON の方法⁹⁾に準じて葉緑素含量を定量した。また、このアセトン抽出液 20

ml を分液ロートに移し、エチルエーテルを同量加えて、ロートの下端をもう1つの同量の水を入れた分液ロートの底に挿入し、エチルエーテル溶液が少しずつ水中を上昇するようにしてエマルジョンの生成をさけながら、アセトン溶液と水にとける色素と、エチルエーテル可溶の色素を分画した。アセトン溶液と水にとける色素(アントシアニン)は比色計(Hitachi 139)を用いて 530 nm で吸光度を測定した。エチルエーテル可溶の色素(光合成色素)は分光光度計(MPS 5000)を用いて可視部(350〜700 nm)の吸光度を測定した。

上記の方法で分画されたエチルエーテル溶液に Na_2SO_4 を 2〜3 g 加え、30分間以上放置し、50 ml 吸収びんに移し、handy aspirator (Yamato 製)でエチルエーテルを蒸発させて乾燥した後、沈澱物に石油エーテル 1 ml を加えてとかし、tert-ブタノール:n-ペンタン:アセトン=0.5:9:0.5 (v/v/v) 混合液を展開溶媒として、石油エーテル試料 50 μl を室温でシリカゲルプレートに展開した。このプレートをデンストメーター(アタコ製)で主な吸光波長である 430 nm と 625 nm のフィルターをかけて吸光度および積算値を求めた。

実験結果

温度処理による葉身の葉緑素含量の変化は第1図のとおりである。常温区に比べ低温区の葉緑素含量は処理7日目にはかなり減少し、減少程度は IR 24 が最も大きく、ササニシキは最も小さく、Milyang No. 23 は両者の中間であった。1週間低温にあわせてから常温にもどすと葉緑素含量は3品種とも増加し、その程度はササニシキ>Milyang No. 23>IR 24 の順であった。葉身のエチルエーテル抽出液の吸収スペクトルは第2図に示すように 432 nm と 657 nm にピークをもつ選択吸収であったが、低温処理によっていずれも両ピークの高さが減少した。その減少程度は

* 大要は第170回講演会(昭和55年9月)において発表。

Fig. 1. Changes of chlorophyll content of rice leaf blades as influenced by temperature treatments.

— 25°/20°C, ---- 17°/12°C

Arrow indicates the change from 17°/12°C to 25°/20°C.

IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順であった。青色部 (425~490 nm) と赤色部 (640~740 nm) の吸収極大値は第1表に示すとおり、低温処理7日目において、ササニシキは赤色部で18%, 青色部で9%, IR 24はそれぞれ31%, 21%, Milyang No. 23はそれぞれ28%, 19% 減少した。14日処理では3品種ともさらに減少した。両部の吸収極大値の比 (青色部/赤色部) は3品種とも低温によって増加したが、7日処理より14日処理の方が大きくなった。品種間の比較では、わずかながら IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順であった。

Fig. 2. Absorption spectra of ethyl ether extracts of rice leaf blades as influenced by temperature treatments.

— at the 7th day under 25°/20°C,
..... at the 7th day under 17°/12°C,
---- at the 14th day under 25°/20°C,
- · - at the 14th day under 17°/12°C,

低温から常温にもどすと生育が回復すると同時に葉色も回復した。この時の吸収スペクトルの変化は第3図のとおりである。低温から常温にもどした場合には3品種とも常温を継続した場合より両ピークが高くなったが、その程度はササニシキ>Milyang No. 23>IR 24の順であった。青色部と赤色部の吸収極大値をみると第2表のとおり、常温を継続した場合より低温から常温にもどした場合の方が両部とも大きくなった。青色部の吸収極大値の赤色部のそれに対する比は3品種とも減少した。アセトンおよび水に溶性の色素量は低温区の方が常温区より増加し、その程度は IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順であった (第4図)。

光合成色素の変化を430 nm と 625 nm のフィルターをかけてデンストメーターで吸光度曲線をしらべた結果は第5, 6図のとおりである。430 nm のフィルターの場合 (第5図) には3品種とも低温区の吸光度がクロロフィル a, b, カロチン, ルテイン, キサンチン, フェオフィチンにおいて、減少した。その程度は IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順であった。またフェオフィチンとカロチンの間には黄色系統の未知の色素が増加した。625 nm のフィルターをかけた場合 (第6図) にも、低温区のクロロフィル a, b およびフェオフィチンの吸光度は3品種とも減

Fig. 3. Absorption spectra of ethyl ether extracts of rice leaf blades as influenced by temperature treatments.

..... at the 7th day under 25°/20°C after treated for 7 days at 17°/12°C,
— at the 14th day under 25°/20°C.

Table 1. Relative values of absorbance at 657 nm, 432 nm and 451 nm, respectively, of ethyl ether extracts of rice leaf blades as influenced by low temperature (17°/12°C)

Variety	Days of low temperature treatments	λ max (nm)				Ratio		
		657 (a) Red	432 (b) Blue	451 (c)	(b+c)	(b/a)	(c/a)	(b+c/a)
Sasanishiki	0	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00
	7	82	88	93	91	1.07	1.13	1.11
	14	70	75	85	80	1.07	1.21	1.14
Milyang No. 23	0	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00
	7	72	78	83	81	1.08	1.15	1.13
	14	54	59	67	63	1.09	1.24	1.17
IR 24	0	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00
	7	69	76	82	79	1.10	1.19	1.15
	14	48	53	62	58	1.10	1.29	1.21

Table 2. Relative values of absorbance at 657 nm, 432 nm and 451 nm, respectively, of ethyl ether extracts of rice leaf blades as influenced by temperature treatments

Variety	Treatment*	λ max (nm)				Ratio		
		657 (a) Red	432 (b) Blue	451 (c)	(b+c)	(b/a)	(c/a)	(b+c/a)
Sasanishiki	1)	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00
	2)	148	141	133	137	0.95	0.90	0.93
Milyang No. 23	1)	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00
	2)	115	110	104	107	0.96	0.90	0.93
IR 24	1)	100	100	100	100	1.00	1.00	1.00
	2)	104	103	101	102	0.99	0.97	0.98

* 1) at the 14 th day under 25°/20°C 2) at the 7 th day under 25°/20°C after treated under 17°/12°C for 7 days.

Fig. 4. Absorbance at 530 nm of acetone- and water-soluble pigments of leaf blades grown under different temperatures for 14 days.

□ : 25°/20°C, ■ : 17°/12°C

少したが、その程度は IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順であった。また、低温区ではスポット部位にシリカゲルと反応したと思われる反応生成物¹⁴⁾が増加した。低温処理による各色素の積算値のクロロフィルの積算値 (100 とする) に対する相対値を第3表

に示した。これによって明らかなように、低温区では黄色系の色素の相対値が常温区にくらべて著しく増加したが、ことにルテインが顕著であった。品種間では IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順に黄色系の色素の相対値が大きかった。

考 察

葉の葉緑素含量は葉の老化にともなって減少^{3,7,13)}、また低温にあらうと減少が促進されるといわれている¹⁰⁾。しかし、稲が一度低温にあってから常温にもどった場合の葉緑素含量の変化についての研究は見当たらない。低温による葉緑素の減少は、すでに形成された葉緑素の分解か、これから形成される葉緑素の形成阻害によると思われる。本実験では、低温 (17°/12°C) から常温 (25°/20°C) にもどした場合の葉緑素含量は、常温を継続した場合より増加したが (第1図)、それは低温下で葉緑素形成が阻害されるととも

Fig. 5. Absorbance curves by densitometer through a 430 nm filter on a silica gel plate of rice leaf blade extracts treated for 14 days under different temperatures. — at the 14 th day under 25°/20°C, at the 14 th day under 17°/12°C. Car.: Carotene, Pheo: Pheophytin, Xan.: Xanthins, Lut.: Lutein, Chl. b: Chlorophyll b, Chl. a: Chlorophyll a

Fig. 6. Absorbance curves by densitometer through a 625 nm filter on a silica gel plate of rice leaf blade extracts treated for 14 days under different temperatures. — at the 14 th day under 25°/20°C, at the 14 th day under 17°/12°C.

Table 3. Relative values of each pigment to that of chlorophyll a (100) in the rice leaf blades grown under different temperatures for 14 days

Pigment	Var. Tem. °C	Sasanishiki			Milyang No. 23			IR 24		
		25/20 (A)	17/12 (B)	B/A	25/20 (A)	17/12 (B)	B/A	25/20 (A)	17/12 (B)	B/A
Chl. a ¹⁾		100	100	1.00	100	100	1.00	100	100	1.00
Pheophytin ¹⁾		60	60	1.00	127	126	0.99	106	114	1.08
Carotene ²⁾		51	79	1.55	77	142	1.84	57	133	2.33
Chl. b ²⁾		86	114	1.33	114	161	1.41	104	179	1.72
Lutein ²⁾		106	141	1.33	142	271	1.91	142	438	3.09
Xanthins ²⁾		52	70	1.35	94	139	1.48	100	179	1.79
Chl. a/Chl. b		1.16	0.88	0.76	0.88	0.62	0.71	0.96	0.56	0.58

1) Values through a 625 nm filter 2) Values through a 430 nm filter.

に既成の葉緑素が分解して一時的にその含量が減少するが、再び温度が上昇すると生育の回復とともに葉緑素の形成が回復するからであろう。一方、継続して常温下にある葉は生育および葉の老化がはやいために、その葉緑素含量の減少もはやいものと思われる。低温による葉緑素含量の減少程度は IR 24 が最も大きく、Milyang No. 23 がこれに次ぎ、ササニシキが最も小さかったが、これは品種間の低温抵抗性のちがい²⁾を裏付けるものであろう。

葉身のエチルエーテル抽出液の吸収スペクトルは青色部と赤色部にピークを示し、青色部では 432 nm、

赤色部では 657 nm でそれぞれ最大の吸光度を示した(第2, 3図)。赤色部の吸収ピークはクロロフィル、青色部のそれはクロロフィルとカロチノイドの両者によるとされている^{5, 11)}。低温処理によって葉色に変色するのは、両部の色素量の減少と同時に青色部、赤色部の吸収極大値の比(青色部/赤色部)の増加、水にとける色素量の増加によると思われる。低温から常温にもどした場合の葉色の回復は、赤色部および青色部の色素量が増加すると同時に両部の吸収極大値の比(青色部/赤色部)の減少、水にとける色素量の減少によると思われる。

低温下で、光合成に有効なクロロフィルがカロチノイドより、またクロロフィル a が b より、それぞれ大きく減少したことは、低温による光合成速度の減退^{4,8,9)}の大きな原因となろう。

以上の結果を総合すると、低温下の葉では光合成色素量の減少（主にクロロフィルの減少）と同時に、黄色系の色素の相対量が緑色系のそれより大きくなって葉色が黄化すると考えられる。この黄化した葉色が温度の上昇につれて緑色に回復するのは、葉緑素量の増加と同時に、緑色色素の相対量が黄色色素より大きくなるからであると考えられる。

低温下では葉色の黄化だけでなく、時には赤色、褐色に変色することがある¹⁰⁾。赤色化はおそらく水溶性のアントシアンの増加によると思われる。褐色化に関する色素は分析しなかったが、おそらくフェノール系物質の増加が関係すると思われる。この点は今後の研究にまわたい。

摘 要

水稻葉色の低温（17°/12°C）による変色および常温（25°/20°C）にもどした時の葉色の回復を、フュイトロンを用いて実験的に再現し、葉緑素含量、吸収スペクトル、色素組成などの面から検討した。

1. 葉身の葉緑素含量は低温によって減少し、低温から常温にもどした場合には、継続して常温においた場合より増加した。その増加程度はササニシキ>Milyang No. 23>IR 24 の順であった（第1図）。

2. 低温により黄化をはじめた葉身のエチルエーテル抽出液の吸収スペクトルのピークの高さは、常温区より減少した。その減少程度は IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順であった。青色部（425~490 nm）と赤色部（640~740 nm）の吸収極大値は、低温処理によって後者の方が前者より大きく減少した（第2図、第1表）。

3. 低温から常温にもどして葉色が回復した葉身のエチルエーテル抽出液の吸収スペクトルのピークは、常温を継続した葉身のそれより高くなった。その程度はササニシキ>Milyang No. 23>IR 24 の順であった。青色部、赤色部の吸収極大値は、葉色回復に伴って赤色部の方が青色部より大きく増加した（第3図、第2表）。

4. 色素の吸光度は3品種とも、低温によって減少した。低温によって黄色系の色素の相対値は、緑色系の色素の相対値にくらべて増加した。その程度は IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順に大きかった

（第5、6図、第3表）。アセトンと水に溶性の色素は低温によって増加したが、その程度は IR 24>Milyang No. 23>ササニシキの順であった（第4図）。

5. 水稻の葉色が低温によって黄色となるのは、葉緑素含量が減少するとともに、黄色系の色素の相対値が増加することによっておこると考察した。低温による変色程度は IR 24（印度型種）が最も大きく、ササニシキ（日本型種）が最も小さく、Milyang No. 23（日印交雑種）がその中間であった。

引用文献

1. 藤田善彦 1980. 光エネルギーの固定. 宮地重遠他編, 光合成と物質生産. 理工学社, 東京. 13—43.
2. KANEDA, C. and H. M. BEACHELL 1974. Response of indica-japonica rice hybrids to low temperatures. SABRAO J. 6: 17—32.
3. KIM, J. H. and Y. W. KWON 1977. Composition of chloroplast pigments, its changes and anthocyanins development after anthesis in the remote rice cultivars. Seoul Natl. Coll. Agr. Bull. 2: 15—28.
4. KISHITANI, S. and S. TSUNODA 1974. Effects of low and high temperature pretreatment on leaf photosynthesis and transpiration in cultivars of *O. sativa*. Photosynthetica 8: 161—167.
5. 玖村敦彦, 石井龍一 1975. 葉における光の反射, 吸収, 透過. 戸荻義次編, 作物の光合成と物質生産. 養賢堂, 東京. 29—34.
6. MCKINNEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll studies. J. Biol. Chem. 140: 315—322.
7. 水落勁美, 藤原彰夫 1962. イネの葉身の色と葉緑素含量について. 土肥誌 33: 405—408.
8. MURATA, Y. 1975. The effects of solar radiation, temperature, and aging on net assimilation rate of crop stands—from the analysis of the “maximal growth rate experiment” of IBP/PP. I. The case of rice plants. Proc. Crop Sci. Soc. Japan 44: 153—159.
9. 佐藤 庚 1970. 水稻の光合成に及ぼす環境の影響. 日作紀 39: 370—375.
10. 佐藤 庚, 朴 慶培 1981. 水稻幼植物の低温障害に関する研究. 第1報 Japonica×indica 品種“統一”の低温による苗の生育, 葉色および葉緑体構造の変化. 日作紀 50: 169—175.
11. 清水 碩 1977. 光合成に関する色素. 石田政弘他編, 光合成器官の細胞生物学. 共立出版, 東京. 237—265.
12. 下郡山正巳 1980. 植物色素の類別とその特性. 林 孝三編, 植物色素. 養賢堂, 東京. 12—55.

13. WOLF, F. T. 1960. Changes in chlorophyll a and b in autumn leaves. *American J. Bot.* **43**: 714—718.
14. 吉浦昌彦, 入出啓治 1979. クロロフィルの調製法と定性定量分析法, 蛋白質・核酸・酵素 **24**: 612—620.

On the Low Temperature Damage in Rice Seedling

II. Varietal difference in discoloration of leaves under low temperature and their restoration to green when moved to normal temperature, with respect to change in pigment compositions

KANOE SATO and KYEONG BAC PARK

(Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980)

Summary

This study was done in phytotron under natural light to clarify the processes of discoloration of rice leaves under low temperature (17°/12°C), and their restoration to green under normal temperature (25°/20°C) switched from low temperature pretreatment, with respect to chlorophyll content and pigment compositions. Results obtained are summarized as follows:

1. The yellowing degree of leaf blades by low temperature coincided with the degree of decrease in chlorophyll content, being highest in IR 24 and lowest in Sasanishiki. The chlorophyll content of leaf blades at the 7th day under normal temperature after low temperature pretreatment for a week increased more than that grown for 2 weeks under normal temperature. The degree of increase was Sasanishiki > Milyang No. 23 > IR 24 in order (Fig. 1).

2. The heights of absorption peaks of ethyl ether extracts of yellowing leaf blades under low temperature decreased compared with those of green leaves under normal temperature. The degree of decrease was IR 24 > Milyang No. 23 > Sasanishiki in order. The maximal absorbance at the red (657 nm) and blue (432, 451 nm) bands under low temperature decreased compared with those under normal temperature, and that at the red band decreased more than at the blue band (Fig. 2, Table 1).

3. The heights of absorption peaks of ethyl ether extracts of greening leaf blades at the 7th day under normal temperature after a week of low temperature pretreatment increased than those under normal temperature for 2 weeks. The degree of increase was Sasanishiki > Milyang No. 23 > IR 24 in order (Fig. 3). The rate of increase at the red band was greater than that at the blue band (Table 2).

4. By low temperature treatment, the relative amount of the yellowish pigments increased more than that of the greenish pigments, and the rate of increase of the former pigments was IR24 > Milyang No. 23 > Sasanishiki in order (Fig. 5, 6 Table 3). The acetone- and water-soluble pigments (anthocyanin) increased under low temperature treatment and the degree of increase was IR24 > Milyang No. 23 > Sasanishiki in order (Fig. 4).

5. It was suggested that the yellowing of rice leaves by low temperature was caused by a decrease of chlorophyll content and by an increase in the ratio of yellowish/greenish pigments in amount, although the contents of both pigments decreased by low temperature. The order of yellowing of leaf color under low temperature was coincided with the order of decrease in chlorophyll content and increase in yellowish/greenish pigments.