低温貯蔵中のヨウサイにおける細胞構造の変化と褐変障害の発生

於勢(平田) 貴美子・茶珍和雄・岩田 隆

大阪府立大学農学部 591 堺市百舌鳥梅町 4 丁

Structural Changes in Cells and Chilling Injury of Water Convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) Stored at Low Temperature

Kimiko HIRATA-OSE, Kazuo CHACHIN and Takashi IWATA

College of Agriculture University of Osaka Prefecture, Mozu-ume-machi, Sakai, Osaka 591

Summary

Changes in leaf and stem tissues and cells of water convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) were studied in relation to chilling injury and browning of young leaves and stem tips. Microscopic observations were made using materials stored at 1 and 20°C for 5 days. While partial browning occurred in the leaves stored at 1°C, samples were prepared from green parts. In the epidermis cells of 1°C-stored leaves many particles stained with azureII-methylene blue and basic fuchsin were found, but no significant change was found in other tissues under light microscopy. In the stems, no influence of low temperature was found.

Under electron microscopy, well developed thylakoids, grana stacks and envelopes were clearly found in the chloroplasts of leaves at harvest. Leaves stored at 20°C showed little change of subcellular components compared with those at harvest. In the 1°C-stored leaves, the chloroplasts were sensitive to chilling temperature. They were swollen and the number of thylakoids and grana stacks decreased. The mitochondrial cristae became somewhat unclear, and a part of the tonoplasts were invaginated into the vacuoles and became unclear. These subcellular changes could play a role in bringing about chilling injury.

緒 言

ヨウサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk.) は沖縄を含め東南アジア地域で広く利用されている野菜であるが、10°C以下の低温に貯蔵すると若葉と若い茎に褐変が発生し、貯蔵期間が長くなるにつれて成熟葉も暗緑色化することを前報で報告した(4)。ヨウサイにおける低温障害の原因として、低温下におけるクロロゲン酸代謝経路の活発化や膜透過性の変化が関係すること(3)、さらにフェノール酸の存在形態の変化も関係する可能性を報告した(5)。

青果物を対象として低温障害の発生過程を組織学的に調査、観察した研究はこれまでにいくらかみられる。ナス果実(1)では pitting や褐変の開始と共にミトコンドリアのマトリクス構造の膨化やトノプラストの部分的消失が観察され、キュウリ果実(8)においては pit-

ting の発生が著しくなるにつれて表皮細胞における核やクロロプラストの崩壊が観察されている。また、14日間低温貯蔵した外観上健全なサツマイモ塊根(15)では、デンプンを含む細胞や原形質膜は健全であるが、液胞膜の部分的消失やミトコンドリアのクリステの膨化などが観察されており、サトイモ塊茎(7)については内部褐変が認められる柔組織の細胞に原形質分離と核の縮小が観察されている。

このように低温障害を組織学的に調査した例は、果菜類や貯蔵器官である根菜類などに限られ、葉菜類についての報告はみられないようである。葉菜類の利用部分は光合成能をもつ組織細胞が大部分を占めているので、それが低温においてどのような変化を示すか興味もたれる。本報告においては、低温障害を発生する葉菜としてヨウサイを材料とし、低温障害の発生に伴う組織形態的な変化を光学顕微鏡で調べると共にクロロプラスト、ミトコンドリア、トノプラストなどの

細胞内小器官の変化を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

実験材料及び方法

1. 貯蔵方法及び試料採取部位

ヨウサイは大阪府立大学付属農場で夏季に栽培したものを、前報(4)と同様に、ポリエチレン袋(厚さ0.03 mm)に密封包装し、1°C及び20°Cに貯蔵した。試料採取部位は顕著な褐変の起こる、若葉及び先端に近い茎とし、若葉は中肋を除いた葉身部分を用いた。試料の採取は収穫当日と、1°Cで低温障害が観察された貯蔵5日後に行った。なお、1°C貯蔵のものの採取部位は、褐変し始めている葉及び茎のうちから、まだ褐色になっていない緑色の部分とした。

2. 光学顕微鏡及び電子顕微鏡用試料作成

串田(12)の方法に従い、葉組織を5%グルタルアルデヒド及び1%四酸化オスミウムで二重固定し、30、

50, 70, 90, 100%のアルコールシリーズでそれぞれ約10分間脱水したものをスパー樹脂で包埋した。超薄切片の作成は、マイクロームKB 8000を用いてガラスナイフで行った。光学顕微鏡での観察には、約200~300 μ mに厚切りした切片をWamkeら(14)の方法に従い、アズールII-メチレンブルーで染色した後、塩基性フクシンで二重染色(以下AM-BF染色と略す)して使用した。また電子顕微鏡観察のための試料は、酢酸ウラン及びクエン酸鉛で電子染色し、電子顕微鏡は日立H-300透過型電子顕微鏡を使用した。

実験結果

1. 葉身及び茎組織の光学顕微鏡による観察

収穫当日の若葉の試料の横断切片をAM-BF染色し光学顕微鏡を用いて観察したところ、ヨウサイの葉組織は、ほぼ四辺形でクロロプラストを持たない表裏面の表皮細胞、それに挟まれた柵状組織と海綿状組織からなり、表皮上にはところどころトリコームが見られた(第1図)。

Fig. 1. Structure of young leaf tissue of water convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) at harvest, showing epidermis(ep), spongy parenchyma(sp), palisade parenchyma(pl) and trichome(tr).

Fig. 3. A cross section of young leaf of water convolvulus stored at 20°C for 5 d. Abbreviations as in Fig. 1.

Fig. 2. Electron micrograph of trichome(tr) on the epidermis(ep) of young water convolvulus at harvest, showing nucleus(N), cuticle layer(cu) and cell wall(cw).

Fig. 4. A cross section of young leaf of water convolvulus stored at 1°C for 5 d. Abbreviations as in Fig. 1.

トリコームは、乳汁や粘液物の分泌細胞の一種で、昆虫などの外敵から植物体を物理的、化学的に防御するための働きをもつものであり(11)、ヨウサイにおいてはフェノール物質を含む乳汁の分泌を行っていると思われる。電子顕微鏡観察によってトリコーム中に蛋白質粒や核が認められた(第2図)。

第3図は20℃貯蔵5日の葉組織の状態を示したものであるが、表皮細胞、柵状組織、海綿状組織はいずれも収穫当日のもの(第1図)との間に特に差異は認められなかった。

1℃貯蔵5日の葉組織では、既に低温障害が発生し、葉身部の表(おもて)面が部分的に褐変症状を示していた。表皮細胞内にAM-BF染色で濃く染まった粒子が多く観察された。葉肉の細胞で構造上の変化は認められなかったが、細胞内では表皮細胞と同様に濃く染色される粒子が多く観察された(第4図)。

ヨウサイの茎は中空で、表皮、厚角組織、皮層及び形成層から成り、厚角組織内には乳管細胞が観察され

た(第5図)。20℃に5日貯蔵した若い茎では乳管細胞にやや変形が認められた(第6図)。また、1℃に5日貯蔵した若い茎の乳管細胞においても20℃貯蔵のものと同様の変化が観察された(第7図)。

2. 葉身における微細構造の電子顕微鏡による観察

収穫当日の葉身の細胞を電子顕微鏡を用いて観察すると、クロロプラストはチラコイドやグラナの積み重なり構造、好オスミウム性顆粒であるプラストグロビュールを含んでおり、包膜も明らかであった(第8-A図)。またトノプラスト及びミトコンドリアもはっきりと認められた(第8-B図)。

対照区である20℃貯蔵5日後の写真を第9図に示した。試料に用いた20℃区の葉身の外観はまだ緑色を保持しており、クロロプラストは第9-A図のようにグラナの積み重なり構造も密で、包膜もはっきりとしていた。しかし、ミトコンドリアの状態は収穫直後のものとは異なり、クリステの数の減少やマトリクスの粗質化が認められた。なお、トノプラストは比較的明確に観察された(第9-B図)。第10~12図に1℃に5日貯蔵した葉の微細構造を示した。この試料に用いた葉身においては、既に低温障害による褐色の斑点が出現していたが、観察用試料には褐変障害がまだ現れていない緑色部分を採取した。クロロプラストの包膜の2重膜ははっきりと認められたが、チラコイドやグラナの積み重なりがややまばらになっているもの(第10-A図)、あるいはグラナの積み重なり構造の数が少なくクロロプラストリボゾームが減少しているものが観察され(第10-B図)、いずれの場合も、クロロプラストの形状は少し膨化していた。また、液胞内にも電子密度の高い物質が認められたり(第11-A図)、トノプラ

Fig. 5. A cross section of young stem of water convolvulus at harvest, showing epidermis(ep), sclerenchyma(scl), cortex(cx), phloem parenchyma/php, xylem parenchyma(xp) and laticifer(la).

Fig. 6. A cross section of young stem of water convolvulus stored at 20°C for 5 d. Abbreviations as in Fig. 5.

Fig. 7. A cross section of young stem of water convolvulus stored at 1°C for 5 d. Abbreviations as in Fig. 5.

ストが液胞内に陥入することによって小胞が形成されているもの(第11-B図)があった。またミトコンドリアのクリステの数が減少しているもの(第12-A図)や、内部構造がほとんど消失しているものもあったが、包膜は明らかに認められた(第12-B図)。

考 察

青果物の低温に対する感受性を組織化学的な立場から研究したものはいくつかみられ、その中で低温障害の発生したナス果実(1)、キュウリ果実(8)、サトイモ塊茎(7)、サツマイモ塊根(15)などにおいては、ミトコ

Fig. 8. Electron micrograph of young leaf of water convolvulus at harvest, showing vacuole(V), chloroplast(C), plastoglobule(pg), stroma thylakoid(ty), chloroplast ribosome(rp) and mitochondria(m). Structures of mitochondria, chloroplast and tonoplast were clearly observed.

Fig. 9. Electron micrograph of young leaf of water convolvulus stored at 20°C for 5 d, showing chloroplast(C), nucleus(N), mitochondria(M) and tonoplast(to). Chloroplast, mitochondria and tonoplast showed little change compared with those at harvest in Fig. 8.

ンドリア及びトノプラストの構造変化の著しいことが報告されている。このような形態変化は低温貯蔵中に起こる不可逆的な変化であるとみなされている。果菜類や根菜類で低温による組織的变化が報告されているのに対し、葉菜類での報告がないのは、葉菜類の低温障害発生事例が少なく、従って研究も非常に限られているからであろう。しかし熱帯原産の葉菜類ではやは

り低温障害が発生するものがあり(4)、クロロプラストを含む組織が、低温に対してどのように反応するかは興味をもたれる。

青果物以外で貯蔵障害を受けた葉の組織的变化を調べた例をみると、カビなどに感染して褐変症状を示すリンゴとナシの葉の光合成組織細胞におけるミトコンドリアや小胞体の構造変化、クロロプラストの形状の

Fig. 10. Electron micrograph of young leaf of water convolvulus stored at 1°C for 5 d, showing chloroplast(C), thylakoid(ty), tonoplast(to) and starch grain(s). Chloroplast was swollen, and the number of thylakoids was reduced.

Fig. 11. Electron micrograph of young leaf of water convolvulus stored at 1°C for 5 d, showing vacuole(V), chloroplast(C) and tonoplast(t). Parts of tonoplast (arrow) invaginated into vacuole. Electron dense substances were found in vacuole.

Fig. 12. Electron micrograph of young leaf of water convolvulus stored at 1°C for 5 d, showing mitochondria(M), vacuole(V) and tonoplasts(to). Cristae of mitochondria became unclear. Tonoplasts (arrow) also became unclear.

変化(10), クロロプラスト内のデンプン粒の異常蓄積やグラナ構造の配列の乱れ(6), プラストグロビュールの増加(14)が観察されており, またミトコンドリアや核は他の細胞内小器官に比べ, 早い時期から構造変化が始まることも示されている。イネ実生の葉(9)においては, 低温感受性の *japonica* 種と *indica* 種との交雑種では, 低温下でクロロプラストのチラコイドの積み重なり構造の崩壊とデンプン粒の蓄積が進み, クロロプラストが膨化するのに対し, 低温耐性の *japonica* 種では変化が見られなかったと報告されている。

サトイモ塊茎においては, 表皮細胞及び維管束組織に多く分布している乳管細胞やタンニン細胞にフェノール物質やポリフェノールオキシターゼの分布が認められると報告されている(7)。これらの物質及び酵素は褐変の発生に関係が深い。そこで乳汁を分泌していると思われるヨウサイのトリコームと低温障害との関係が考えられたが, 低温障害の発生に伴う形態的变化は観察されず, 低温に対して耐性のある細胞と思われた。茎組織の乳管細胞においては低温貯蔵中にやや潰れることが観察されたが, 20°C貯蔵においても同様の変化が観察され低温の影響は明らかではなかった。その他の細胞でも低温による構造変化は観察されなかった。

ヨウサイの低温障害の症状は葉の表(おもて)面から出始めたが, 低温において葉組織を光学顕微鏡により観察すると, 葉の裏面に比べ, 表面の表皮細胞内に

AM-BF で濃い青色に染まる粒子が多く出現した。これは低温障害の発生前にすでになんらかの物質が形成され始めていることを示している。

Episcia reptans の根(2)の低温障害の発生過程において, 外観的に症状がほとんど認められない時期に微細構造に変化が生じ始め, またトノプラスト, 核, ミトコンドリアの部分的崩壊が観察されている。トノプラストの変化は, 液胞内の化学成分の細胞質への漏出とそれに伴う細胞質の pH の変化を引き起こすことによって細胞内の代謝に大きな影響を及ぼすと思われる, また細胞内小器官の膜の構造変化は膜結合型酵素の活性にも影響すると推察される。本研究の低温貯蔵したヨウサイの葉身でも, 褐変が発生していない部分においてクロロプラストのチラコイドがまばらになり, クロロプラスト自身が膨化していることが観察され, クロロプラストの低温感受性の高いことが認められた。またミトコンドリアのクリステの数の減少やトノプラストの液胞内への陥入などの構造変化も観察された。このような構造変化は各々の持つ機能を低下させていると思われる。これらの変化がみられる時期が外観的に観察される褐変の発生に先行することは, 前報(3)の結果と併せ考えると, これらの変化が, 褐変現象に関連するフェノール物質の生成・蓄積に密接に関係しているのではないかと推察される。

摘 要

ヨウサイの低温障害発生に伴う葉や茎の組織及び細胞内小器官の変化を調べた。光学顕微鏡を用いてヨウサイの葉の細胞を観察したところ、20℃5日貯蔵の葉では、収穫当初のものと比べて特に変わるところはなかった。1℃5日貯蔵の葉ではすでに一部に褐変が出現していたが、外観上障害のみられない部位を採って調べたところ、表皮細胞内部にAM-BFによって濃く染まる粒子がみいだされたが、他の組織には明らかな変化は認められなかった。茎については低温による影響は特に見られなかった。

電子顕微鏡で葉の細胞内小器官を観察すると、収穫直後においてはクロロプラストはチラコイドやグラナの積み重なり構造が密で包膜も明確であり、ミトコンドリアやトノプラストも明らかに認められた。20℃5日貯蔵では、収穫直後とほとんど変わらなかった。これに対し、1℃に貯蔵した葉では、クロロプラストの外膜の2重膜は認められたがチラコイドやグラナの積み重なりがまばらになっているものや、クロロプラストの形状が少し膨化しているものがあつた。その他にも液胞内に電子密度の高い物質が認められたり、トノプラストの乱れが観察された。また、ミトコンドリアのクリステがやや不明瞭になっているものも一部観察された。

以上のように、低温(1℃)に貯蔵したヨウサイにおいて細胞内小器官に形態的变化が観察されたが、特にクロロプラストでは他の小器官よりも変化が顕著でクロロプラストの低温感受性の高いことが認められた。

謝 辞 本研究を行うにあたり、組織形態学的及び組織化学的方法について御指導並びに有益な御助言を頂きました大阪府立大学農学部植物病理学研究室の谷多喜郎博士、大木理博士並びにタイ国カセサート大学のPissawan Chiemsombat 博士に心から御礼申し上げます。

引用文献

- 阿部一博・緒方邦安. 1978. ナス果実の低温障害に関する研究。(第4報)障害の進展に伴う細胞の微細構造の変化. 園学雑. 46: 541-547.
- DAVIES, N. L. and J. M. WILSON. 1984. Ultrastructural study of chilling injury in root of *Episcia reptans* (Mart.). Planta 160: 185-189.
- 平田貴美子・茶珍和雄・岩田 隆. 1986. ヨウサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk.) の低温障害発生に伴う K⁺ 漏出速度、遊離アミノ酸含量並びにフェニルプロパノイド代謝の変化. 園学雑. 55: 516-523.
- 平田貴美子・茶珍和雄・岩田 隆. 1987. 熱帯・亜熱帯地域で利用されている数種野菜の貯蔵性. 日食工誌. 34: 566-573.
- 平田貴美子・茶珍和雄・岩田 隆. 1989. ヨウサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk.) の低温障害発生に伴うフェノール物質の存在形態の変化. 日食工誌. 36: 45-51.
- 福富雅夫・赤井重恭・白石雅也. 1971. カビの高等植物への感染. 細胞 3: 18-26.
- 李 正吉・岩田正利. 1982. サトイモ塊茎の貯蔵中に発生する低温障害の組織形態学的観察. 園学雑. 51: 362-368.
- 李 正吉・岩田正利. 1983. キュウリ果実の貯蔵中に発生する低温障害の組織形態学的観察. 園学雑. 51: 231-236.
- PARK, I. and S. TSUNODA. 1979. Effect of low temperature on chloroplast structure in cultivars of rice. Plant and Cell Physiol. 20: 1449-1453.
- PARK, P., S. NISHIMURA, K. KOHMOTO and H. OTANI. 1981. Comparative effects of host-specific toxins from four pathotypes of *Alternaria alternata* on the ultrastructure of host cells. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 47: 488-500.
- SHEPARDSON, S. 1982. Ultrastructure of protein crystals in potato and tomato trichomes. Ann. Bot. 49: 503-508.
- 串田 弘. 1979. 統超薄切片法 6 低粘性エポキシ樹脂包埋法. 細胞 11: 475-478.
- 植田利喜造・犀川政稔. 1969. 葉緑体の微細構造. 細胞 1: 1-11.
- WAMKE, H. E. and S. J. LEE. 1976. Improved staining procedures for semithin epoxy sections of plant tissues. Stain Technology 51: 179-185.
- YAMAKI, S. and I. URITANI. 1973. Morphological changes in chilling injured sweet potato root. Agri. Biol. Chem. 37: 183-186.