グラジオラス花被の生長に伴う水分生理、 炭水化物含量および酸性インベルターゼ活性の変化

山根健治*・河端実之・崎山亮三

東京大学農学部 113 東京都文京区弥生

Changes in Water Relations, Carbohydrate Contents, and Acid Invertase Activity Associated with
Perianth Elongation during Anthesis of Cut Gladiolus Flowers

Kenji Yamane, Saneyuki Kawabata and Ryoza Sakiyama

Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113

Summary

Changes in water relations, carbohydrate contents, and acid invertase activity in expanding gladiolus perianths on cut stems were studied.

1. The specific rate of elongation of the perianth was fastest just before anthesis, but slowed down while the floral organs unfolded; it approached zero as the perianth became fully expanded.

2. Pressure potential of tissue water was high while the perianth was growing rapidly.

3. Fructose and glucose were the predominant soluble sugars in the perianth. These solutes were considered to contribute to the low osmotic potential of perianth tissues during their elongation process.

4. Acid invertase activity of perianth tissue was correlated to the specific rate of elongation. There was no correlation between the enzyme activity and the growth rate when the perianth was wilting.

5. Starch in florets was considered to be the primary source of soluble carbohydrates which contribute to the early stages of flower expansion.

6. At the wilting stage, soluble sugars were probably translocated from the perianth to other organs.

緒 言

グラジオラスの切り花において、穂状花序の先端部の小花はしばしば発達が止まりプラスチックしたり、開花しても十分な大きさに発達しないことがあり、インタクトな植物体の小花よりも品質が低くなることがしばしばある(4, 11, 18)。プラスチックを生じた小花は、花芽が分化していながら、花被の生長が停止し、開花しない(15)。また、花被の生長によって決まる花の大きさはグラジオラスの重要な品質の一つである(17)。

開花の際、花卉は細胞肥大によって急速に生長することが多くの研究者により報告されている(8)。一般に植物細胞の肥大生長は膨圧(Ψ_p)により生じた細胞壁の降伏、すなわち細胞壁の塑性変形に起因するとさ

れている(1)。また、植物細胞の高い浸透圧を維持する能力は肥大生長にとって必須である(1)。Hoら(7)やEvansら(2)は、バラ花卉中のデンプンが分解されて生成する可溶性糖が浸透物質として働き、細胞の浸透ポテンシャル(Ψ_s)を低くして、細胞肥大のための水の取り込みを促進すると報告した。

Ferreiraら(4)はグラジオラスの小花のデンプン含量は、穂状花序の先端の方が少ないことを明らかにし、それが先端部の小花が開花しない原因であると報告している。この報告に従えば、小花のデンプンは可溶性糖の供給源といえる。

また、開花中のグラジオラスの穂状花序は高いシンク活性を示すことが報告されている(16)。転流されたスクロースを分解する酵素として酸性インベルターゼがある(13)。グラジオラスの花被中には高い酸性イン

1990年10月16日 受理。

*現在：宇都宮大学農学部。

ペルターゼ活性があり (6), 還元糖がスクロースよりも多く含まれる (10) ことが報告されている。この酸性インペルターゼ活性は細胞の還元糖濃度および肥大生長の速度と高い正の相関をもつことが報告されている (13)。これらの報告によると, 酸性インペルターゼが開花の際の花被の生長に関係があることが予測される。

本研究ではこの予測を確かめるために, グラジオラスの花被の長さの相対生長速度 (RGR) と Ψ_p , Ψ_s , 炭水化物含量および酸性インペルターゼ活性との関連について検討した。

材料および方法

1989年4月29日, 5月18日および5月25日の3回にわけてグラジオラス球根 (品種 White Giant) を東京大学農学部ハウスの内に植え付けた。それぞれの植え付け日の植物体が開花期に入った7月17日から24日に実験1を, 8月4日から11日に実験2を, 8月12日から14日に実験3を行った。

実験1: Ferreira ら (4) の方法を参考にして小花の発達ステージを6段階に区分した (第1表, 第1図)。

花序の最下部の第1花の花被がステージ1となったときに, 葉を3, 4枚付けて約110 cmの長さに切り, 茎を脱塩水に浸し, 第1花の高さで約 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ (蛍光灯と陽光ランプ) の24時間日長で 25°C , 75~90%RHの条件下に置いた。

第4花の花被の長さをステージ1から6までの期間測定した。小花の包葉を1枚切除し, 第2図のような

装置を組み立て, 変位変換器 (Hottinger Baldwin Messtechnik 社) を用いて花被の縦方向の長さの変化を連続的に測定し, その3時間ごとの値から相対生長速度 (RGR) を算出して時間当たり%で示した。測定は1回行った。

第3, 4, 5花の小花を上記の六つのステージでサンプリングした。ステージ3, 4, 5の小花では, 各花被片を縦方向に切り離し, それぞれの切片を炭水化物分析用と酸性インペルターゼ活性測定用の試料とした。1花被の新鮮重が小さいステージ1, 2, 6では2, 3個の小花の花被をそれぞれの測定用の試料とした。反復はすべて5回とした。

炭水化物分析用の試料0.5~1 gを3日間凍結乾燥した後, 乳鉢で磨砕し, 内部標準として10%ラムノースを $50 \mu\text{l}$ 加え, 80%エタノールで1時間抽出した。抽出液を $3000 \text{ rpm} \times 30$ 分間遠心分離して得られた上澄み

Table 1. Developmental stages of a gladiolus floret. Perianths were sampled at these stages.

Stage	State of perianth
1	Perianth just emerges out of bracts.
2	Perianth emerges about 1.5 cm out of bracts.
3	Perianth emerges about 3.0 cm out of bracts.
4	Perianth is unfolded to such an extent that stamens become visible.
5	Perianth is completely unfolded with the extension growth ceasing.
6	Perianth is wilted.

Fig. 1. Developmental stages of a gladiolus floret.

Fig. 2. Mechanism for measurements of perianth elongation on a cut gladiolus spike using a continuous-displacement transducer. An end of teflon tube was fixed at the basal part of a bract where the base of a perianth was located. A thread was fixed at the top of a perianth with adhesive tape.

からロータリーエバポレーターによって40℃でエタノールを除去した。エタノールを除いた液に脱塩水をMILLI-QLabo (Millipore 社)に通した精製水1 mlと CH_2Cl_2 0.2 mlを加えてよく混ぜ、15000 rpm×10 分間遠心分離し、水層から200 μl を取った。これにアセトニトリル600 μl を加えてよく混ぜ、高速液体クロマトグラフィー(島津製作所)によりShim-pack CLC- NH_2 カラム(島津製作所)を用いて糖を分析した。

デンプンの定量のためにエタノール不溶性成分を回収し、水を加えて1時間煮沸し、5分間超音波処理してデンプンを糊化分散させた。この試料を2 M 酢酸緩衝液(pH 4.5)中に溶かし、アミログルコシダーゼ(Nagase 社)を加えて30℃で2時間反応させ、グルコース生成量をF-キット(Behringer-Manheim 社)を用いて測定し、デンプン量に換算した。

酸性インペルターゼ活性測定用の試料約1 gを-20℃で保存した後、試料約1 gに4 M NaCl 5 ml, 50 mM EDTA 5 ml, 0.1 N NaOH 20 ml, 0.4 M HEPES 10 ml, Dithiothreitol 0.04 gを含む緩衝液(pH 7.5)を加えて磨砕した。磨砕液を15000 rpm×10 分間遠心分離して得た上澄みを粗酵素液とした。この粗酵素液を、セファデックス G 25 カラムに通し、その後10 mM HEPES-3.3 mM NaOH 緩衝液(pH 6.8)を流下して得た1 mlのタンパク画分を酵素液とした。酵素液を酢酸緩衝液中で1 M スクロースと30℃で30 分間反応させ、グルコース生成量をF-キットを用いて測定した。また、粗酵素液およびゲルろ過後の酵素液のタンパク質含量をLowry法(9)によって測定し、ゲルろ過による希釈率を計算した。グルコース生成量と希釈率から試料の新鮮重をベースとした酸性インペルターゼ活性を算出した。

実験2: 実験1と同様にして得たグラジオラスの切り花を、20℃、70%RHの条件下に置いた。その他の環境条件、ならびに花被の長さのRGRの測定、サンプリング、糖分析、デンプンの定量および酸性インペルターゼ活性の測定のそれぞれの方法は実験1と同じとした。

炭水化物分析用の試料を用いて、花被組織の水ポテンシャル(Ψ_w)、 Ψ_s 、 Ψ_p を以下のように測定した。花被の中央部の5 mmの正方形の組織と、花被の基部の管状になっている部分の長さ5 mmの組織を切り取り、それぞれ別のサンプルチェンバー内に入れ、約25分後にサイクロメーター(Wescor 社)を用いて、 Ψ_w を測定した。測定後その組織を凍結した後、室温で解凍し、その水ポテンシャルを測定し、その値を組織の

Ψ_s とした。 Ψ_p は Ψ_w と Ψ_s の差により推定した。

実験3: 実験1と同様にして得たグラジオラスの切り花を、30℃、75%RHの条件下に置き、花被の長さのRGRを測定した。その他の環境条件は実験1と同じとした。

結 果

花被の長さの生長曲線を第3図に示した。図中に各ステージに対応する時期を示した。20℃(実験2)では測定開始(ステージ1)から40時間後までゆるやかに、その後90時間後まで急速に生長した(ステージ2、3)。その後、開花を始める(ステージ4)とゆるやかな生長に戻り、120時間後に生長を停止し、満開(ステージ5)となった。25℃(実験1)ではステージ1からステージ2、3にかけて盛んに生長し、50時間(ステージ4)後からゆるやかになり、72時間後にはほぼ生長を停止した(ステージ5)。30℃(実験3)では測定開始6時間後まで急速に生長した後、15時間後までゆるやかに生長した。その後再び生長が盛んになったが、48時間後から次第にゆるやかになり、やがて止まった。

花被の長さのRGRの経時変化を第4図に示した。20℃ではステージ1のRGRは $0.5\% \text{hr}^{-1}$ で、ステージ2から $1\% \text{hr}^{-1}$ を越え、ステージ3で最大 $1.5\% \text{hr}^{-1}$ となった後、ステージ4で著しく低下し、ステージ5ではほぼ $0\% \text{hr}^{-1}$ となった。25℃ではステージ1から2まで $1\% \text{hr}^{-1}$ 前後で、ステージ3で $1.6\% \text{hr}^{-1}$ 以上を示し、ステージ4で著しく低下した後、ステージ5ではほぼ $0\% \text{hr}^{-1}$ となった。30℃ではステージ1の初期のRGRは約2%

Fig. 3. Growth curves of elongating perianths on a cut gladiolus spike held at 20°, 25°, and 30°C in growth chambers. The arrows with the figure indicate the developmental stages of florets when measurements were taken (Table 1, Fig. 1).

Fig. 4. Changes in specific rates of elongation of perianths on a cut gladiolus spike at 20°, 25°, and 30°C derived from data in Fig. 3. The arrows with the figure indicate the developmental stages of florets (see Table 1 and Fig. 1).

hr^{-1} であり、その後一時 $0.5\%\text{hr}^{-1}$ 以下まで低下し、ステージ3で再び $2\%\text{hr}^{-1}$ 以上になった後、他の温度の場合と同様に低下した。

第5図に20°C（実験2）の花被の中央部と基部の Ψ_w , Ψ_s , Ψ_p の変化を示した。花被の中央部の Ψ_p はステージ1で 0.33 MPa で、ステージ2でわずかに低下し、ステージ3で最大の 0.40 MPa となり、ステージ4から低下し、ステージ5で最低の 0.08 MPa となり、ステージ6で 0.18 MPa まで上昇した。花被の基部の Ψ_p はステージ1では 0.20 MPa と低く、ステージ2から4にかけて上昇し、ステージ4で 0.37 MPa となった後、ステージ5で低下し、ステージ6で再び上昇した。

花被の中央部の Ψ_s はステージ1から3まで -1.0 MPa 以下に保たれ、ステージ4で -0.85 MPa になり、ステージ6で著しく低下した。花被の基部の Ψ_s はステージ1から5まで次第に低下し、ステージ6で著しく低下した。

第6図に花被の可溶性糖濃度と1花被当たりの可溶性糖含量の変化を示した。フルクトースとグルコースが多く含まれ、スクロースは低い濃度であった。還元糖濃度は花被の発達につれてゆるやかに上昇し、またスクロース濃度はステージ1から5では低く、ステージ6で上昇した（第6図A）。1花被当たりの還元糖含量はステージ5まで増加し、ステージ6で著しく減少したのに対して、スクロース含量はステージ5、6でわずかな増加を示した（第6図B）。

花被の新鮮重当たりの酸性インペルターゼ活性の変化を第7図に示した。20°Cでは、ステージ1で 5.5 nkatgFW^{-1} で、ステージ2で 8.7 に上昇し、ステージ3で 7.1 となり、その後ステージ4から6では 5.0 前後となった。25°Cではステージ1で 8.9 nkatgFW^{-1} で

Fig. 5. Changes in water potential (circles), osmotic potential (squares), and pressure potential (triangles) of perianths on a cut gladiolus spike held at 20°C. Measurements were taken on tissues from the basal (solid symbols) and middle parts (open symbols) of perianths. Vertical bars are S.E.

あり、その後ステージ4まで7.5以上を保ち、ステージ5で著しく低下し、ステージ6で再び上昇した。

第8図にデンプンの1花被当たりの含量と新鮮重当たり濃度を示した。デンプン含量および濃度は花被の生長とともに低下した。特にステージ1からステージ2にかけての低下は顕著であった。

第9図に花被の新鮮重、乾物重およびタンパク質含量の変化を示した。新鮮重および乾物重はステージ5から6にかけて著しく低下した。タンパク質含量はステージ1から2にかけて減少し、ステージ5まではほぼ一定を保ち、ステージ6で再び減少した。

Fig. 6. Changes in concentration (A) and content (B) of fructose (circles), glucose (squares), and sucrose (triangles) in perianths on a cut gladiolus spike held at 20° (open symbols) and 25°C (solid symbols). Vertical bars are S.E.

Fig. 7. Changes in acid invertase activity of perianths of a cut gladiolus spike held at 20° (open symbols) and 25°C (solid symbols). Vertical bars are S.E.

考 察

花被の長さのRGRと Ψ_p の関係を20°Cの結果(第4, 5図)によって調べてみると、RGRが高いステージでは Ψ_p が高い傾向にあった。ステージ1から5において、花被中央部と基部の Ψ_p の平均値と花被の長さのRGRには10%で有意な正の相関($r=0.84$)があった(第10図)。

Ψ_s の変化には可溶性成分の濃度が影響する。1花被に含まれるエタノール可溶性成分のうち可溶性糖の占める割合は全ステージにおいて約50%であった(データは省略)。その可溶性糖のうちではフルクトースとグルコースの還元糖が多く、スクロースが非常に少なかった(第6図)。この結果はMarousky (10)の報告と一致した。これらのことは、還元糖濃度が Ψ_s の変化に役割を果たしていることを示唆している。

20°Cにおけるグラジオラス花被の酸性インペルターゼ活性はステージ2, 3で高く(第7図)、その時期は花被の生長が盛んな時期と一致した(第4図)。また、25°Cの酸性インペルターゼ活性はステージ1から高い活性を示し(第7図)、一方花被の長さのRGRはステージ1から1% hr^{-1} 以上と高かった。20°Cおよび25°Cでのステージ1から5の酸性インペルターゼ活性の平均値と花被の長さのRGRには正の相関($r=0.76^*$)があった(第11図)。これらの事実は、酸性インペルターゼ活性が高いことが花被の生長を促進する可能性を示した。

以上のことから、グラジオラス花被の、RGRが高い組織では、高い酸性インペルターゼ活性があり、それにより還元糖の濃度が高まり、 Ψ_s が低く保たれ、そのことが高い Ψ_p の維持に寄与していると結論した。酸性

Fig. 8. Changes in starch content (squares) and concentration (circles) in perianths of a cut gladiolus spike held at 20° (open symbols) and 25°C (solid symbols). Vertical bars are S.E.

Fig. 9. Changes in fresh (circles) and dry weight (triangles) (A) and protein content (squares) (B) of perianths on a cut gladiolus spike held at 20°C (open symbols) and 25°C (solid symbols). Vertical bars are S.E.

Fig. 10. Relationship between the specific rates of elongation (from Fig. 4) and the mean pressure potentials of the basal and middle parts (from Fig. 5) of perianths at stages 1 to 5 on a cut gladiolus spike held at 20°C. ^z: Significant at 10%.

Fig. 11. Relationship between mean acid invertase activity (from Fig. 7) and the specific rates of elongation (from Fig. 4) of perianths at stage 1 to 5 on a cut gladiolus spike held at 20°C and 25°C. *: Significant at 5%.

インペルターゼ活性は植物の根、茎および葉において、細胞の肥大生長と正の相関があることが報告されている(13)。本研究はグラジオラス花被の長さのRGRと酸性インペルターゼ活性に相関があることを明らかにした(第11図)。

本研究ではグラジオラス花被全長のRGRのみを調べ、

花被の部分によるRGRの相違については調べなかった。しかし、花被の中央部の Ψ_p の変化(第5図)が花被全体のRGRの変化(第4図)とよく一致したことや、花被の中央部の Ψ_s がステージ4で高くなった(第5図)とき花被全体の還元糖濃度がわずかに低下した(第6図A)ことから、花被中央部の生長量の方が基部の生

長量よりも大きいために、花被の基部よりも中央部の水分生理が花被全長の RGR と強く関係するのではないかと考えられた。

花被の生長末期に当たるステージ 6 では他のステージとは異なる傾向を示した。20℃ではステージ 6 において Ψ_p が高まった(第 5 図)。この現象はカーネーション (3)、ガーベラ (12) でも報告されているが、原因は不明である。また、25℃では酸性インペルターゼ活性がステージ 6 で再び高まった(第 7 図)にもかかわらず、花被は生長しなかった(第 3、4 図)。これらの報告や観察結果は、酸性インペルターゼ活性および Ψ_p が高いことが花被の生長に必要なものであるが、生長にはその他の要因も関与していることを示すものと考えられた。

1 花被当たりのエタノール不溶性成分の重量からタンパク質とデンプンの重量を差し引いた値はステージ 1 から 3 まで著しく増加したが、その後は一定であった(データは省略)。ここで、タンパク質とデンプン以外のエタノール不溶性分画が細胞壁を構成する多糖類から構成されるとみなすと、花被が生長するためには、細胞壁の生合成も必要であると推察できる。

Ferreira ら (4) は、小花のデンプン含量がその開花に重要であると報告している。花被のデンプン含量はステージ 1 からステージ 2 にかけて大きく低下し、ステージ 2 では 20℃では、1 花被の乾物重の約 3% に当たる 3.3 mg しか含まれなかった(第 8 図)。したがって、デンプンの分解により生ずる可溶性糖が花被の生長に寄与する時期はステージ 1 から 2 に限られた。

カーネーション (14) およびハイビスカス (19) について報告されているように、本実験のグラジオラスの場合にも花被の老化の際、新鮮重、乾物重およびタンパク質含量が顕著に減少した(第 9 図)。還元糖濃度はステージ 5 から 6 にかけて著しく減少したが、スクロースは増加し(第 6 図 A)、その結果、還元糖に対するスクロース濃度の比が高まった。スクロース/還元糖比が高まる現象は、しおれた花卉から他の器官へ糖が再転流することと関係があると報告されている(5)。本研究における還元糖量の減少にも、花被から他の器官への再転流が関係していることが予想される。今後、グラジオラス切り花の日持ちの向上のためにも糖の転流に関してさらに詳しく調べる必要がある。

本研究では、正常に発達した小花の花被の生長のみを調べたために、小花のブラスチングの発生防止について直接の対策を見出しではない。しかし、ブラス

チングは生長の停止であるという見地から、その問題解決のためには、基質と酵素の両者について検討する必要があることが示唆された。

摘 要

グラジオラス切り花の小花の生長に伴う花被内の水分生理、炭水化物含量および酸性インペルターゼ活性の変化について調べた。

1. 花被の長さの相対生長速度は開花直前にピークをもち、開花を開始すると低下し、満開になるとほぼ 0 になった。
2. 花被の組織の膨圧は、花被の細胞の肥大生長が盛んな時期に高い傾向があった。
3. フルクトースとグルコースが主な可溶性糖であり、浸透ポテンシャルの維持に寄与していると考えられた。
4. 花被の酸性インペルターゼ活性はしおれたステージを除いて、花被の長さの相対生長速度と正の相関があった。
5. 小花に含まれるデンプンは、花被の初期の生長段階に可溶性糖の供給源として寄与していると考えられた。
6. 花被がしおれるときに、花被から他の器官への糖の再転流が起こっている可能性が示唆された。

引用文献

1. Cosgrove, D. 1986. Biophysical control of plant cell growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 377-405.
2. Evans, R. Y. and M. S. Reid. 1988. Changes in carbohydrates and osmotic potential during rhythmic expansion of rose petals. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 884-888.
3. Eze, J. M. O., S. Mayak., J. E. Thompson and E. B. Dumbroff. 1986. Senescence in cut carnation flowers: Temporal and physiological relationships among water status, ethylene, abscisic acid and membrane permeability. *Physiol. Plant.* 68: 323-328.
4. Ferreira, D. I., J. J. Merwe and G. H. Swardt. 1986. Starch metabolism in flowers of senescing gladioli inflorescences. *Acta Hort.* 177: 203-210.
5. Halaba, J. and R. M. Rudnicki. 1989. Invertase inhibitor in wilting flower petals. *Scientia Hort.* 40: 83-90.
6. Hawker, J. S., R. R. Walker and H. P. Ruffner. 1976. Invertase and sucrose synthase in flowers. *Phytochemistry* 15: 1441-1443.
7. Ho, L. C. and R. Nichols. 1977. Translocation of ^{14}C -sucrose in relation to changes in carbohydrate content in rose corollas cut at different stages of

- development. Ann. Bot. 41 : 227-242.
8. Koning, R.E. 1984. The role of plant hormones in the growth of the corolla of *Gaillardia grandiflora* (Asteraceae) ray flowers. Amer. J. Bot. 71 : 1-8.
 9. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
 10. Marousky, F.J. 1971. Influence of 8-hydroxy-quinoline citrate and sucrose on carbohydrate content of leaves and florets of cut gladiolus spikes. Acta Hort. 23 : 127-131.
 11. Mayak, S., B. Brado., A. Gvilli and A.H. Halevy. 1973. Improvement of opening of cut gladioli flowers by pretreatment with high sugar concentrations. Scientia Hortic. 1 : 357-365.
 12. Meeteren, U. Van. 1979. Water relations and keeping-quality of cut gerbera flowers. IV. Internal water relations of ageing petal-tissue. Scientia Hortic. 11 : 83-93.
 13. Morris, D.A. and E.D. Arthur. 1984. Invertase activity in sinks undergoing cell expansion. Plant Growth Reg. 2 : 327-337.
 14. Nichols, R. and L.C. Ho. 1975. An effect of ethylene on the distribution of ^{14}C -sucrose from the petals to other flower parts in the senescent cut inflorescence of *Dianthus caryophyllus*. Ann. Bot. 39 : 433-438.
 15. Ramanuja Rao, I.V. and H.Y. Mohan Ram. 1981. Nature of differences between green-bud and tight-bud spikes of gladiolus: Basis for a postharvest bud-opening treatment. Indian J. Exp. Biol. 19 : 1116-1120.
 16. Robinson, M., I. Harav., A.H. Halevy and Z. Plaut. 1980. Distribution of assimilates from various sources leaves during the development of *Gradiolus grandiflorus*. Ann. Bot. 5 : 113-122.
 17. Salunkhe, D.K., N.R. Bhat and B.B. Desai. 1990. Postharvest biotechnology of flowers and ornamental plants. p. 100. Springer-Verlag, Berlin.
 18. Shillo, R. and A.H. Halevy. 1976. Inflorescence development of flowering and blasted gladiolus plants in relation to development of other plant parts. Scientia Hortic. 4 : 79-86.
 19. Woodson, W.R. and A.K. Handa. 1987. Changes in protein patterns and in vivo protein synthesis during presenescence and senescence of hibiscus petals. J. Plant. Physiol. 128 : 67-75.