カボチャ属における連続光誘導クロロシス発現の品種間差異と抗酸化酵素活性

村上賢治*・織田裕美・梶田正治

岡山大学農学部 700-8530 岡山市津島中1-1-1

Varietal Differences in Continuous Light-induced Chlorosis and Antioxidative Enzymatic Activities in *Cucurbita*

Kenji Murakami, Hiromi Orita and Masaharu Masuda

Faculty of Agriculture, Okayama University, 1-1-1, Tsushimanaka Okayama 700-8530

Summary

The varietal differences in response to continuous light exposure of *Cucurbita* plants were investigated in relation to antioxidative enzymatic activity. In cultivars of *C. moschata* except 'Butternut', chlorosis did not occur, and plants grew vigorously even at 24/0 hr. Chlorosis developed at the 3-leaf stage in *C. moschata* 'Butternut' and the two cultivars of *C. maxima* at 24/0 hr. Activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), and catalase in the 3rd true leaf were determined in 'Butternut' (*C. moschata* sensitive to continuous light) and 'Hyuga No.14' (*C. moschata* tolerant to continuous light) at the 3rd leaf stage. In 'Butternut', the activities of SOD and APX at 24/0 hr were 4- and 2-fold higher than those at 12/12 hr, respectively, whereas catalase activity was slightly higher at 24/0 hr. The hydrogen peroxide content in leaves was also higher at 24/0 hr. In 'Hyuga No.14', no differences were noted between the two photoperiodic treatments in these antioxidative enzymatic activities and hydrogen peroxide content. These results indicate that continuous-light induced oxidative stress is associated with leaf injury in 'Butternut'.

Key Words: antioxidative enzyme, continuous light, *Cucurbita moschata*, leaf chlorosis, oxidative stress

緒 言

人工照明を用いた閉鎖空間での作物生産では、全ての要因を生育最適条件とすることが可能であり、極地、地下、さらに宇宙ステーションにまで生産の場を設定することができる。現在、閉鎖型生産システムは、種々の野菜の育苗や葉菜類の栽培において実用化されつつある。

果菜類の栽培では一般に、葉菜類より強光を必要とする。しかし、閉鎖空間内での強光は、照明装置からの発生熱を冷却するために莫大な電力を必要とする。この問題を解決するために、照明時間を長くして弱光でも同化量を増加させる方法が考えられる。Masuda・Murage (1998)は、トウガラシが、蛍光灯による弱光下でも連続照明とすることにより旺盛に生育し多数の果実を生産することを明らかにした。一方、同じナス科でもナスは、連続光下では葉に障害が発現し、正常に生育しないことが報告されている (Murageら, 1996)。

連続弱光下で旺盛に生育する形質は、閉鎖人工照明下

での栽培では極めて有用であり、その機構と遺伝様式を解明し、他の作物へ導入することは、作物生産の「場」を拓げるための有効な手段となりうる。連続光耐性機構解明のためには、耐性に関与する形質のみ異なる near-isogenic な系統の組み合わせを用いることが有効である。

Murage・Masuda (1997)は、ナスの連続光誘導障害発現への活性酸素の関与を示唆した。その後、梶田ら (2000)は、セイヨウカボチャでは連続光下で障害が発現するが、ニホンカボチャの多くの品種では障害は発現せず旺盛に生育することを報告した。本研究ではさらに、ニホンカボチャにおいて連続光応答反応に顕著な品種間差異を見出し、感受性品種と耐性品種の抗酸化酵素活性を比較検討し、障害発現における活性酸素消去系の関与について考察した。

材料および方法

ニホンカボチャ (*Cucurbita moschata* Duch) '日向14号'、'鹿ヶ谷'、'白菊座'、'鶴首'、'バターナッツ'の5品種、セイヨウカボチャ (*Cucurbita maxima* Duch) '芳香青皮栗'および'デリシャス'の2品種を供試した。

120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ の弱光を三波長型昼白色蛍光灯

により照射し、気温は $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度は 70~80% に保った。子葉展開直後に $7.5 \times 7.5 \times 5$ (cm) のロックウールに移植し、各品種 4~6 個体ずつを、連続照明下と 12 時間照明下 (午前 6 時から午後 6 時まで点灯) で栽培した。標準濃度の大家 A 処方培養液を 1 日 1 回かん水した。光処理開始後 13 日目 (第 3 葉展開約 1 週間目) の午前 10 時~12 時に、クロロシス発現程度を評価するために葉緑素計 (SPAD-502, ミノルタ製) を用いて第 3 葉の緑色度を測定した。

‘バターナッツ’ と ‘日向 14 号’ については、第 3 葉を液体窒素で凍結して -20°C で保存し、superoxide dismutase (SOD) 活性を nitroblue tetrazolium 法 (Beyer・Fridovich, 1987), ascorbate peroxidase (APX) 活性を Nakano・Asada (1981) の方法、カタラーゼ (CAT) 活性を Klapheck ら (1990) の方法、過酸化水素濃度をチタニウム

法 (Brennan・Frenkel, 1977) により測定した。いずれの酵素も、試料の全タンパク質濃度を牛血清アルブミン (SIGMA) を標準として Bradford (1976) 法により測定し、タンパク質当たりの活性を算出した。

結果および考察

‘バターナッツ’ を除くニホンカボチャ品種は、連続照明下でもクロロシスを起こさず旺盛に生育し、葉の緑色度は 12 時間照明より高くなった。セイヨウカボチャ 2 品種もクロロシス発現したが、‘デリシャス’ はその程度が弱く、葉の緑色度は連続照明下の方が高かった。‘バターナッツ’ は最も著しくクロロシスを生じた (第 1 表)。

連続光感受性の ‘バターナッツ’ では、SOD, APX および CAT とも、連続照明下で活性が上昇した。過酸化水素含量も連続照明下で高くなった。これに対し連続光耐性の ‘日向 14 号’ では、両区間でいずれの酵素活性および過酸化水素含量にも差がなかった (第 2 表)。

光酸化障害は、光化学系 II の D1 タンパク質が活性酸素により切断されることによると考えられている (Miyao, 1994)。光過剰下の植物体での抗酸化酵素活性の上昇は、多くの種において報告されている。本研究の結果、連続光感受性の ‘バターナッツ’ は、連続照明下での SOD および APX 活性が顕著に高く、かつ過酸化水素含量も高かった。このことから、活性酸素が障害に関係していると考えられた。一方、連続光耐性の ‘日向 14 号’ では連続照明下でも SOD 活性の上昇はみられなかった。これは、連続光下において感受性のナスでは SOD 活性が上昇し、耐性のトウガラシでは SOD 活性がほとんど上昇しないとする報告 (Murage・Masuda, 1997) と同様である。同氏は、トウガラシは葉の CAT 活性が高かったことから、障害回避に CAT が強く関与していることを認めている。しかし本研究では、連続光耐性の ‘日向 14 号’ でも CAT 活性の上昇はみられなかった。

連続光耐性の ‘日向 14 号’ は、連続光下でも活性酸素

Table 1. Chlorosis in 3rd true leaves of seedlings grown under either 12/12 hr (light/dark) or continuous light for 13 days from the cotyledonary stage. Values are means $\pm$ SE.

Variety	Chlorosis ^z	Relative chlorophyll conc. ^y	
		12/12 hr (light/dark)	Continuous light
<i>Cucurbita moschata</i>			
Hyuga No.14	-	42.8 ± 1.0	52.6 ± 0.8
Shishigatani	-	39.2 ± 1.0	47.5 ± 0.4
Shiro-gikuza	-	45.3 ± 0.4	55.5 ± 1.7
Tsurukubi	-	40.9 ± 1.3	54.0 ± 1.1
Butternut	+	42.0 ± 1.3	32.2 ± 1.9
<i>Cucurbita maxima</i>			
Hokou-aokawa-kuri	+	35.0 ± 0.6	34.3 ± 0.5
Delicious	+	40.3 ± 1.2	45.7 ± 2.3

^z+: occurred, -: not occurred.

^yValues by a chlorophyll meter (SPAD-502, Minolta Co., Ltd., Japan).

Table 2. Enzymatic activities and hydrogen peroxide content in the 3rd true leaf of seedlings grown under either 12/12 hr (light/dark) or continuous light for 13 days from the cotyledonary stage. Values are means $\pm$ SE.

Variety	Treatment	Enzymatic activities			Content of H_2O_2^w
		SOD ^z	APX ^y	CAT ^x	
Butternut	12/12 hr (light/dark)	42 ± 6	0.29 ± 0.05	7.0 ± 0.4	5.06 ± 0.62
	Continuous light	175 ± 11	0.66 ± 0.05	8.6 ± 0.4	8.56 ± 0.37
Hyuga No.14	12/12 hr (light/dark)	105 ± 16	0.48 ± 0.11	8.2 ± 0.4	3.89 ± 0.85
	Continuous light	91 ± 6	0.43 ± 0.02	8.4 ± 1.0	4.81 ± 0.37

^z Units $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein.

^y μmol ascorbic acid $\cdot \text{mg}^{-1}$ protein.

^x μmol $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ protein.

^w $\mu\text{mol} \cdot \text{gFW}^{-1}$.

の消去サイクルの収支バランスが崩れず、障害が起こらないと考えられる。このことを詳細に検討するためには、他の抗酸化酵素活性、グルタチオンおよびアスコルビン酸含量を経時的に測定する必要がある。また、カロテノイドによる光障害の回避や、キサントフィルサイクルによる過剰な光エネルギーの回避能力などについても検討する必要がある。

本研究の結果、ニホンカボチャはセイヨウカボチャとは異なり一般に連続光耐性を有するが、'バターナッツ'は特異的に顕著な障害を示し、この障害に活性酸素が関与していることが示唆された。今後はさらに生理・遺伝学的側面から、連続光障害の原因と耐性機構を多角的に検討する必要がある。

摘 要

カボチャ属における連続光応答反応の品種間差異と、抗酸化酵素活性との関連について検討を行った。ニホンカボチャ (*Cucurbita moschata*) 'バターナッツ' およびセイヨウカボチャ (*C. maxima*) は、連続光下でクロロシスを発現した。クロロシス程度は、'バターナッツ' が最も大きかった。他のニホンカボチャ品種は、障害を発現せず旺盛に生育した。連続光障害の発現する 'バターナッツ' と障害の発現しない '日向 14 号' について、第 3 葉の superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) およびカタラーゼ (CAT) 活性、過酸化水素含量を測定した。連続光区の 'バターナッツ' は 12 時間照明区と比較して、SOD は約 4 倍、APX は約 2 倍、CAT 活性はわずかに高く、過酸化水素含量も高かった。これに対し '日向 14 号' は、両区間でいずれの抗酸化酵素活性にも差がなく、過酸化水素含量も差がなかった。以上の結果、ニホンカボチャはセイヨウカボチャとは異なり一般に連続光耐性を有するが、'バターナッツ' は特異的に顕著な障害を示し、これに活性酸素が関与していることが示唆された。

引 用 文 献

- Beyer, W. F. Jr and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brennan, T. and C. Frenkel. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* 59: 411-416.
- Klapheck, S., I. Zimmer and H. Cosse. 1990. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 31: 1005-1013.
- Masuda, M. and E. N. Murage 1998. Continuous fluorescent illumination enhances growth and fruiting of pepper. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 862-865.
- 榊田正治・村上賢治・池田康弘. 2000. カボチャ属の西洋種と日本種における連続光誘導ネクロシス発現の差異とその様相. *園学雑*. 69 (別 1): 116.
- Miyao, M. 1994. Involvement of active oxygen species in degradation of the D1 protein under strong illumination in isolated sub-complexes of photosystem II. *Biochemistry* 33: 9722-9730.
- Murage, E. N. and M. Masuda 1997. Continuous light induced changes in activities of antioxidant enzymes in pepper and eggplant seedlings. *Scientia Hort.* 70: 269-279.
- Murage, E. N. Y. Sato and M. Masuda 1996. Relationship between dark period, and leaf chlorosis, potassium, magnesium and calcium content of young eggplants. *Scientia Hort.* 66: 9-16.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Beyer, W. F. Jr and I. Fridovich. 1987. Assaying for super-