CaCl₂ が切り花の抗酸化酵素活性に及ぼす影響

趙 習コウ¹・李 進才¹・中野浩平²・前澤重禮²

¹ 中国天津大学農業与生物工程学院

² 岐阜大学応用生物科学部

Effect of CaCl₂ Application on Antioxidative Enzyme Activities of Cut Flowers

Xiheng ZHAO¹, Jincai LI¹, Kohei NAKANO² and Shigenori MAEZAWA²

¹Agriculture and Biological Engineering School of Tianjin University, Tianjin 300072 China

²Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193 Japan

Abstract

CaCl₂ has been known to have an ability to suppress the senescence of cut flowers. In the present study, we investigated the effect of CaCl₂ on the antioxidative enzyme activities in cut flowers of *Rosa hybrida* and *Dendrobium phalaenopsis* during postharvest storage. The activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in the cut flowers with treatment of 45 mM CaCl₂ in vase water were higher than those without CaCl₂ during storage. These results suggest that calcium ion can contribute to the quality maintenance of cut flowers through activating the antioxidative enzyme activities.

Keywords: antioxidative enzyme activity, CaCl₂, cut flower, senescence

緒 言

切り花の老化は、エチレン生成や呼吸基質の消耗を伴い、病原菌感染や環境条件にも大きく影響される。収穫後の切り花は、常に水分、養分、光条件などの環境ストレスに遭遇するため、活性酸素の生成・蓄積が多くなりやすい。切り花の老化は花卉細胞内で過剰に蓄積した活性酸素が膜脂質を過酸化することで促進させることが指摘されている(Mayark *et al.*, 1983; Paulin, 1992)。一方、切り花は活性酸素から身を守るために、活性酸素を消去する抗酸化酵素の活性を調節して、抗酸化機能を発現すること(Droillard *et al.*, 1987; Bartoli *et al.*, 1995; Xue and Lin, 1999; Yamane *et al.*, 1999)も知られている。

カルシウム無機塩類のCaCl₂やCa(NO₃)₂は、切り花の老化抑制(品質保持)に有効であり、その効果として、エチレン生成と病原菌による発病の抑制(Volpin and Elad, 1991)、呼吸作用の抑制と吸水の促進(Gong *et al.*, 2000; Wang and Jia, 2001; Chen, 2003; Chen *et al.*, 2004)、細胞壁構造の強化と細胞膜機能の維持(Bolivar *et al.*, 1999)などが報告されている。一方、収穫後の青果物においては品質保持剤としたCaCl₂の使用は貯蔵中の抗酸化酵素活性に関与すること(Yu and Xi, 1997; Su *et al.*, 2001)が報告されており、切り花においても品質保持剤としてのCaCl₂は抗酸化酵素の活性調節に関与する可能性が考えられる。

本研究では、バラとランのデンファレの両切り花を供試し、品質保持剤としてのCaCl₂の使用がタンパク質とマロンジアルデヒド(MDA)含量、および抗酸化酵素活性に及ぼす影響を調査し、CaCl₂による切り花の老化抑制における抗酸化機能の関連性を検討した。

2005年 8月11日受付

2005年 12月24日受理

Corresponding author: Shigenori Maezawa

fax: +81-58-293-2840

(maezawa@cc.gifu-u.ac.jp)

材料および方法

天津大学の圃場で栽培されたバラ(*Rosa hybrida* cv. *karolinal*) およびランのデンファレ (*Dendrobium phalaenopsis*) を収穫し、前者にあつては花茎に着生した葉を摘除して、花茎の長さをそれぞれ 25 cm, 15 cm に調整した。

実験処理は温度 20 ~ 24℃, 湿度 65 ~ 78% の室内で行い, CaCl₂ 45 mM の溶液 (500 ml) を処理液として用いた (CaCl₂ 区)。対照区として蒸留水を用いた。処理中, 両実験区とも 2 日ごとに処理液を更新した。分析用としてバラ 68 本, デンファレ 52 本を, 日持ち検査用として両切り花ともに 12 本を供試した。

日持ち期間は, バラでは首曲りが観察されるまで, デンファレでは小花の落花までの期間とした。

分析用の花卉として, バラでは外から中へ数えた 4 ~ 15 番目の花卉 12 枚を, デンファレでは下から上へ数えた 3 ~ 5 番目の小花三つを採取した。両切り花ともに 4 本の繰り返しで行った。採取したサンプルは, 速やかに細断して 2 g ずつ秤量し, 液体窒素で凍結して -80℃ に保存した。凍結試料について以下の測定を行った。

老化指標としてのタンパク質含量は Lowry (1951) の方法に, MDA 含量は Zhao *et al.* (2003) の方法に従って測定した。抗酸化酵素スーパーオキシジスムターゼ (SOD), カタラーゼ (CAT), アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) の活性は Li and Matsui (2001) の方法により測定し, 新鮮重当たりの酵素活性を算出した。ペルオキシダーゼ (POD) 活性は Zhao *et al.* (2003) の方法に従った。

結 果

1. 老化指標の変化

第 1 図にバラおよびデンファレ切り花の日持ち期間を示した。両切り花とも, CaCl₂ 区の日持ち期間は対照区に比べ有意に延長した。

第 2 図に両切り花のタンパク質と MDA 含量の経時変化を示した。バラのタンパク質含量は, CaCl₂ 区において処理 1 日目に対照区に比べ高くなり, その後低下し, 4 日目は対照区より高い値を示した。デンファレでも, 処理 4 日目を以降で CaCl₂ 区は対照区に比べ高い値を示した。

MDA 含量は, バラでは, 処理開始から 5 日目まで CaCl₂ 区と対照区との差がなかったが, その後 CaCl₂ 区は対照区より低い値を示した。デンファレでも, 処理 6 日目を以降で CaCl₂ 区は対照区に比べ低い値を示した。

図 1 対照区 (水) (□) および CaCl₂ 区 (■) に挿したバラおよびデンファレ切り花の日持ち。図中の縦線は標準誤差 (n = 12) を示す。

Fig. 1 Vase life in cut flowers of *Rosa hybrida* and *Dendrobium phalaenopsis* at control (water) (□) and CaCl₂ (■) of vase water. Vertical bars indicate SE (n=12).

2. 抗酸化酵素活性の変化

第 3 図に両切り花の SOD, CAT, POD, および APX 活性の経時変化を示した。SOD 活性に関して, バラでは, 対照区は処理開始から漸次低下したが, CaCl₂ 区の低下は対照区より 3 日間遅れ, 3 日目を以降も高く推移した。デンファレでは, 処理開始から対照区は 2 日目まで上昇したが, CaCl₂ 区は 4 日目まで上昇して 4 日目を以降は対照区より高い値で推移した。

CAT 活性に関して, バラでは, 対照区は処理開始から 3 日目まで大きく変化した, CaCl₂ 区の変化は小さく, 3 日目を以降 CaCl₂ 区は対照区より高い値で推移した。デンファレでも, CaCl₂ 区は処理 4 日目を以降で対照区に比べ高い値で推移した。

POD 活性に関して, バラでは, CaCl₂ 区は処理 1 日目から漸次上昇し, 3 日目を以降大きく上昇したが, 対照区では上昇傾向が小さかった。デンファレでも, 処理 2 日目を以降 CaCl₂ 区は対照区より高い値で推移した。

APX 含量に関して, バラでは, 対照区が処理開始から 4 日目まで大きく上昇し, その後は大きく低下したが, CaCl₂ 区は処理 6 日目までに対照区よりも小さい値で推移した。デンファレでも, CaCl₂ 区の変化は対照区より小さかった。

考 察

切り花 (Bartoli *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1998; Xue and Lin,

図2 対照区(水)(○)およびCaCl₂区(●)に挿したバラおよびデンファレ切り花のタンパク質とマロンジアルデヒド(MDA)含量の変化。図中の縦線は標準誤差(n=4)を示す。

Fig. 2 Changes in contents of protein and malondialdehyde (MDA) in the cut flowers of *Rosa hybrida* and *Dendrobium phalaenopsis* during senescence at control (water) (○) and CaCl₂ (●) of vase water. Vertical bars indicate SE (n=4).

1999; Wu *et al.*, 2003) ではタンパク質の減少および活性酸素による脂質の過酸化反応で生じた最終産物 MDA の増加が老化の指標とされている。本実験においては、バラ、デンファレの両切り花とも CaCl₂ 区では対照区に比べ日持ち期間は延長し、老化指標のタンパク質含量は処理 4 日目以降で高い値を、MDA 含量は処理 6 日目以降で低い値を示した。これらの結果から、バラとデンファレ切り花において品質保持剤としての CaCl₂ が両切り花の老化を明確に抑制しているのを確認することができた。カルシウム無機塩類 CaCl₂ あるいは Ca(NO₃)₂ の使用は、バラ切り花 (Wang and Jia, 2001; Chen, 2003) でも、ガーベラ (Gerasopoulos and Chebi, 1999; Chen *et al.*, 2004) およびカーネーション (Gislerø, 1999) 切り花においても日持ち期間を延長し老化抑制に関与していることが認められている。

切り花の老化抑制に関するカルシウム無機塩類 CaCl₂ や Ca(NO₃)₂ の効果としては、これまでにエチレン生成と病原菌による発病の抑制 (Volpin and Elad, 1991)、呼吸作用の抑制と吸水の促進 (Gong *et al.*, 2000; Wang and Jia, 2001; Chen, 2003; Chen *et al.*, 2004)、細胞壁構造の強化と細胞膜機能の維持 (Bolivar *et al.*, 1999) などが報告され、収穫後の青果物でもこれらの作用が観察されている (Glenn *et al.*, 1988; Ferguson and Watkin, 1989)。本実験では、CaCl₂ 区

の抗酸化酵素 SOD, CAT および POD は処理 3 日目頃以降に対照区に比べ高い活性がみられ、この結果から、品質保持剤としての CaCl₂ はバラとデンファレ切り花の抗酸化酵素の活性化あるいは抗酸化酵素活性の維持に関与していることが明らかになった。このような抗酸化酵素に対する CaCl₂ の調節作用は、青果物 (Yu and Xi, 1997; Su *et al.*, 2001) でも報告されている。

植物細胞内で生成した活性酸素スーパーオキシド (O₂⁻) は SOD により H₂O₂ に変換され、H₂O₂ は CAT や POD, APX によって H₂O に還元される。O₂⁻ と H₂O₂ はスムーズに消去されずに蓄積すると、Haber-Weiss 反応あるいは Fenton 反応によって反応性のより高いヒドロキシルラジカル (・OH) などの活性酸素が生じてしまい、タンパク質の酸化的損傷、脂質の過酸化などを誘導して老化を促進させる。品質保持剤としての CaCl₂ は、抗酸化酵素の活性化あるいは活性維持の調節作用を通して花卉細胞内の活性酸素を低いレベルに保ち、バラとデンファレ切り花の老化抑制に関与していると考えられる。このように、品質保持剤としての CaCl₂ がバラとデンファレ切り花の抗酸化酵素活性の調節に関与していることは、両切り花の日持ち期間の延長、処理 4 日目以降の高いタンパク質含量と低い MDA 含量にも反映されていると考えられる。

APX は、H₂O₂ に対する親和性が高く、活性酸素の生成部位に広く存在するため、定常状態時も環境ストレス応答時も細胞内の H₂O₂ を効率的に消去している (Shigeoka *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 2002)。本実験においては、バラとデンファレ切り花に対する水分、養分および光条件は収穫前と大きく異なるため、両切り花が常にこれらのストレスにさらされ、活性酸素の生成が収穫前に比べ多くなっていたと思われる。CaCl₂ 区では、前述の、SOD, CAT および POD が活性化されていることとともに、呼吸作用の抑制および吸水促進 (Gong *et al.*, 2000; Wang and Jia, 2001; Chen, 2003; Chen *et al.*, 2004) の水分ストレス軽減から H₂O₂ の生成も対照区に比べ少なかった可能性も考えられる。一方、対照区では、処理 4 日目頃までに H₂O₂ の生成が CaCl₂ 区より多く、それを消去するよう、APX の活性は CaCl₂ 区の以上に高くなっていたと推測される。

日持ち性は切り花の重要な品質特性の一つである。遺伝学的に日持ち性の良い品種を育種することは重要であるが、品質保持剤による日持ち性の向上も図られている。現在、品質保持剤の最も重要な成分となっているのはチオ硫酸銀錯塩 (STS) などのエチレン阻害剤である。カルシウム無機塩類の CaCl₂ や Ca(NO₃)₂ は STS に比べ無毒、無環境汚染、廉価で、糖や殺菌剤、界面活性剤と組み合わせて使用すれば効果的であり (Gong *et al.*, 2000)、今後の実用化が望まれるであろう。

図3 対照区(水)(○)およびCaCl₂区(●)に挿したバラおよびデンファレ切り花のスーパーオキシジスムターゼ(SOD),カタラーゼ(CAT),ペルオキシダーゼ(POD)とアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)活性の変化。図中の縦線は標準誤差(n=4)を示す。O₂:酸素, AsA:アスコルビン酸。

Fig. 3 Changes in activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) in the cut flowers of *Rosa hybrida* and *Dendrobium phalaenopsis* during senescence at control (water) (○) and CaCl₂ (●) of vase water. Vertical bars indicate SE (n = 4). O₂: oxygen. AsA: ascorbic acid.

摘要

バラおよびランのデンファレ切り花の抗酸化酵素活性に及ぼす品質保持剤としてのCaCl₂の影響を検討した。CaCl₂ 45 mMを用いたCaCl₂区では、蒸留水の対照区に比べ両切り

花ともに抗酸化酵素スーパーオキシジスムターゼ(SOD),カタラーゼ(CAT)およびペルオキシダーゼ(POD)の高い活性がみられた。これらの結果より、品質保持剤としてのCaCl₂はバラとデンファレ切り花の抗酸化酵素を活性化することが明らかになり、この抗酸化機能への調節作用を通して、両切り花の品質保持に関与すると考えられる。

引用文献

- Bartoli, C. G., Simontacchi, M., Guamet, L. L., Montaldi, E., Puntarulo, S. 1995. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* RAM petals. *Plant Sci.* 104: 161-168.
- Bolivar, P., Fischer, G., Fl rez, V. J., Mora, A. 1999. Effect of pre- and postharvest treatments on flower longevity of 'Ariana' cut roses. *Acta Hort.* 482: 83-85.
- Chen, D. S. 2003. Extension of Ca²⁺ on vaselife of cut rose (in Chinese). *J. Guangxi Acad.Sci.* 19(3): 122-124.
- Chen, D. S., Li, N. H., Wang, J. M., Ding, Y. X., Wang, X. J. 2004. Effect of calcium chloride on preservation of cut-flowers of *Gerbera hybrida* (in Chinese). *Acta Botan. Yunnanica* 26: 345-348.
- Droillard, M. J., Paulin, A., Massot, J. C. 1987. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 71: 197-202.
- Ferguson, I. B., Watkin, C. B. 1989. Bitter pit in apple fruit. *Hort. Rev.* 11: 289-355.
- Gerasopoulos, D., Chebi, B. 1999. Effects of pre- and postharvest calcium applications on the vase life of cut gerberas. *J. Hort. Sci. Biotch.* 74(1): 78-81.
- Gislerø, H. R. 1999. The role of calcium on several aspects of plant and flower quality from a floricultural perspective. *Acta Hort.* 481: 345-351.
- Glenn, G. M., Reddy, A. S. N., Poovaiah, B. W. 1988. Effect of calcium on cell structure, protein phosphorylation and protein profile in senescing apples. *Plant Cell Physiol.* 29: 565-572.
- Gong, B., Ma, H. L., Jia, D. H., Hu, J. N. 2000. Selection of vase water including Ca²⁺ and effect on the rose cut flowers (in Chinese). *North. Hort.* 135: 38-39.
- Li, J., Matsui, S. 2001. Effects of chilling on antioxidative enzymes in leaves of *Cattleya* and *Cymbidium* (in Japanese). *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 70: 360-365.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mayark, S. Raymond, L. L., John, E. T. 1983. Superoxide radical production by microsomal membranes from senescing carnation flowers: An effect on membrane fluidity. *Phytochem.* 22: 1375-1380.
- Paulin, A. 1992. New strategies to control cut flowers

- senescence evolution. *Acta Hort.* 307: 189–202.
- Shigeoka, S., Ishiawa, T., Tamoi., M., Miygawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53: 1305–1319.
- Su, T. M., Hu, C. S., Deng, J. W., Chen, C. 2001. Influence of CaCl_2 treatment on Nai plum's physiology and biochemistry in the period room temperature preservation (in Chinese). *Life Sci. Res.* 5(2): 164–168.
- Su, Q., Lang, S., Yang, Y. 1998. Changes of activity of protective enzymes during flower senescence in tulip (in Chinese). *Acta Bot. Boreal. Occident. Sin.* 18: 561–565.
- Volpin, H., Elad, Y. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to gray mold. *Phytopathol.* 81: 1390–1394.
- Wang, W. X., Jia, D. H. 2001. The function and mechanism of Ca^{2+} on cut flowers' longevity of *Rosa chinensis* (in Chinese). *J. Hubei Agr. College* 21(1): 21–24.
- Wu, L., Huang, M., Cai, S. 2003. Active oxygen metabolism in cut *Phalaenopsis amabilis* during senescence and its regulation (in Chinese). *Chi. J. Tropical Crops.* 24: 63–69.
- Xue, Q. H., Lin, R. 1999. Relation between senescence of rose, water content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes (in Chinese). *J. Fijian Agr. Univ.* 28(3): 304–308.
- Yamane, K., Kawabata, S., Fujishige, N. 1999. Changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase during senescence of gladiolus florets. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 798–802.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T., Shigeoka, S. 2002. Identification of a *cis* element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase Pre-mRNA in higher plants. *J. Biol. Chem.* 277: 40623–40632.
- Yu, T., Xi, Y. 1997. Effects of CaCl_2 , AsA and GSH on inhibiting chilling induced oxidative stress on eggplant (*Solanum melongena* L.) fruits (in Chinese). *Acta Agr. Univ. Jiangxiensis* 19(4): 66–70.
- Zhao, X., Li, J., Matsui, S., Maezawa, S. 2003. Antioxidative levels in leaves at the different nodal positions of cucumber (*Cucumis sativus* L.) (in Japanese). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72: 324–328.