

第2章

切り花における糖輸送経路の解析

多くの切り花で生け水に加えた糖は老化を遅らせ、観賞期間を長くする働きのあることが明らかになっている (Ichimura et al., 2003; van Doorn et al., 1991)。これは茎の切り口から吸収された糖が花に移行して花卉細胞内の浸透圧を高め、その結果吸水力が高まるためと思われる (Ho and Nichols, 1977)。また、花に移行した糖は呼吸基質としてのエネルギー源や各種反応における炭素源としてだけでなく、多くの遺伝子発現を制御するシグナルとしての働きを担っていることが知られている (Koch, 1996; Rolland et al., 2002; Smeekens, 2000)。このように、転流糖の代謝は植物の成長において重要な意義を持つ。また糖添加が開花に及ぼす効果は、収穫する蕾のステージによって変化する。収穫後の開花のしやすさは蕾に含まれる糖質含量と相関が見られ、蕾の段階で糖質含量の高いバラ品種‘デリーラ’は収穫後に糖処理をしなくても開花程度が高いが、糖含量の高くない‘ソニア’は糖処理により開花程度が上昇する (Ichimura et al., 2005)。これは、開花における糖質の重要性を示す顕著な例といえる。

切り花に処理する際の最適な糖濃度は花の種類によって異なり、濃度が高すぎると葉害を生じるため、葉害が出ない濃度を検討する必要がある (Shimizu-Yumoto, 2009)。一般的に糖は葉に障害を起こしやすいため、バラやトルコギキョウなど葉のある切り花では比較的低濃度の処理が適当である場合が多い。こうした結果は切り花に与えた糖の多くが葉に移動していることを示唆している。またトルコギキョウでは、処理したスクロースが葉や茎から花卉に輸送されることが示されている (Shimizu-Yumoto et al., 2009)。従って、切り花の葉は処理した糖の輸送や代謝に影響を与えている可能性がある

る。バラ切り花において、葉は蒸散により木部中の負の静水圧を形成し、水の引き上げに大きく貢献している。一般に、葉を取り除いた切り花では活け水の吸水量が大きく減少し、開花が十分に進行しなくなってしまう。さらに、切り花の葉や茎は糖の貯蔵器官としても機能している。例えばキクでは、葉や茎に蓄積している可溶性糖の量が、切り花にした際の鑑賞期間に影響することが報告されている (Ishikawa et al., 2006)。しかし、切り花に与えた糖の輸送経路はカーネーションなど限られた花でしか調べられておらず (Paulin and Jamain, 1982)、糖の輸送における葉の役割の詳細は明らかとなっていない。

そこで本章では、RI でラベルした糖 (^{14}C Glucose) を利用して、切り花の茎の切り口に与えた糖の輸送経路を明らかにすることを試みた。

予想される経路としては、(i) 切り口からそのまま導管を流れて花卉に到達する経路、(ii) 切り口から導管を流れて葉に到達し、そこで転流糖に再合成され、師管を通じて花卉に到達する経路、の2つが考えられる。

材料および方法

実験材料

滋賀県の大井バラ園で栽培管理されているバラ‘イブピアッチェ’ (*Rosa* ‘Meivildo’) を用いた。葉の有無が花卉成長や花卉中の糖含量に与える影響を調べた実験では、出荷の目安となる収穫ステージよりも2日早く採花したもの (Tight Bud Stage, Fig. 1A) を使用した。一方、RI ラベルした糖を利用した切り花の糖輸送経路の解析では、出荷の目安となる収穫ステージで採花したもの (Mature Bud Stage, Fig. 1B) を使用した。

葉の有無、糖処理の有無が花卉成長に与える影響の解析

切り花処理

Tight Bud Stage で採花したバラを、三枚葉を2節残し茎長 25 cm に統一してから、水中で茎を切り戻した。その後、以下の処理を行った。

- ①：葉を全て取り除き、脱イオン水で処理 (葉なし・糖なし区)
- ②：葉を全て取り除き、1% (w/v) グルコース溶液で処理 (葉なし・糖あり区)
- ③：葉は三枚葉のものを2節茎に残し、脱イオン水で処理 (葉あり・糖なし区)
- ④：葉は三枚葉のものを2節茎に残し、1% (w/v) グルコース溶液で処理 (葉あり・糖あり区)

各処理区の個体は 25°C・60% 相対湿度・光量子束密度 75-90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ・16 時間日長の条件でグローブチャンバー (BioTron; Nippon Medical & Chemical Instruments Co., Ltd.) 内に置いた。2 日おきに外側から 5 枚の花弁と葉を採取し、液体窒素で凍結させた後使用するまで -80°C で保存した。また、植物体の新鮮重を経時的に測定し、その新鮮重変化から相対成長率を求めた。相対成長率は処理後日数 T_n における新鮮重を W_n

とすると、

相対成長率 = $(\ln W_{n+1} - \ln W_n) / (T_{n+1} - T_n)$ の式で求めた。

糖含量測定

第 1 章に記載した方法に従った。

切り花の糖輸送経路

切り花処理

2% (w/v) グルコース溶液に ^{14}C グルコース (Amersham Bioscience, UK) を加え (最終濃度 0.174 Ci/mmol)、これを処理液とした。Mature Bud Stage で採花したバラを、三枚葉を 2 節残し茎長 25 cm に統一してから、水中で茎を切り戻した。各切り前を処理液に浸し、25°C・60% 相対湿度・光量子束密度 75-90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ・16 時間日長の条件でグロースチャンバー内に置いた。1 日おきに外側から 5 枚の花弁と全ての葉を採取し、液体窒素で凍結させた後使用するまで -80°C で保存した。

放射線量の測定

上記の方法で糖を抽出・精製し、リテンションタイムから HPLC システム (655 A-11 LC; Hitachi, Japan) を用いてグルコース画分とスクロース画分を分取した。分取した各画分を遠心エバポレーターにより乾固し、シンチゾル (DOJINDO, Japan) を 1 ml 加えて懸濁した。液体シンチレーションカウンター (LSC-5100; Aloka, Japan) を使用して試料の放射線量を 10 分間測定した。

結果

葉の有無、糖処理の有無が花卉成長に与える影響

花卉新鮮重と切り花の相対成長率の変化

全ての処理区において、花卉新鮮重は処理 2 日後まで上昇し、4 日後にかけて減少した (Fig. 14A)。また花卉新鮮重は「葉あり・糖あり区」で最も大きくなり、「葉なし・糖なし区」で最も小さくなった。

切り花全体の相対成長率の減少は、「葉なし・糖なし区」で最も早くなり、「葉なし・糖あり区」と「葉あり・糖なし区」は同程度の減少傾向を見せた (Fig. 14B)。またこの 3 区では処理 3 日後の時点で相対成長率がマイナスになった。一方、「葉あり・糖あり区」の相対成長率の減少は処理区中で最も緩やかとなり、処理 4 日後でもプラスの成長率を示した。

花卉中糖含量の変化

花卉中のスクロース含量は、全ての処理区において処理 0 日から 2 日後にかけて減少し、処理 4 日後では処理 2 日後と同程度の値を示した (Fig. 15A)。またスクロース含量は、「葉あり・糖あり区」、「葉あり・糖なし区」、「葉なし・糖あり区」、「葉なし・糖なし区」の順に高くなる傾向が見られた。またこの時、「葉あり区」では「葉なし区」に比べスクロース含量が高く保たれていた。

グルコース含量について、「葉なし区」ではグルコース含量は処理後減少し続けた (Fig. 15B)。一方、「葉のあり区」では処理 0 日から 2 日後にかけて減少し、処理 4 日後では処理 2 日後よりも値が増加した。またスクロースと同様に、「葉あり区」では「葉なし区」に比べグルコース含量が高く保たれていた。

フルクトース含量の変化も、グルコース含量の変化と同様の傾向を示し、「葉なし区」ではフルクトース含量は処理後減少し続けた (Fig. 15C)。一方、「葉あり区」では処理 0 日から 2 日後にかけて減少し、処理 4 日後では処理 2 日後よりも値が増加した。フルクトース含量も、「葉あり区」では「葉なし区」に比べ値が高く保たれていた。

切り花の糖輸送経路

糖含量の変化

Mature Bud Stage で採花した花を脱イオン水で処理したときの葉における糖含量の変化を調べたところ、スクロース含量、グルコース含量およびフルクトース含量は全て経時的な増加傾向を示した (Fig. 16)。新鮮重あたりの各糖含量は、グルコースとフルクトース含量に比べスクロース含量が高くなった。

次に Mature Bud Stage で採花した花を 2%グルコース溶液で処理した時の葉および花における糖含量の変化を調べたところ、脱イオン水で処理したときと同様に、スクロース含量、グルコース含量およびフルクトース含量は全て経時的な増加傾向を示した (Fig. 17)。各成分の量を比較すると、グルコース処理により葉には非常に多くのグルコースが蓄積しており、スクロース含量も時間と共に大きく増加した。フルクトース含量も経時的に増加しているが、処理 12 時間後までは増加が緩やかだった。また、新鮮重あたりのフルクトース含量は、グルコースとスクロース含量に比べて低くなった。このとき、花弁中の糖含量も、葉と同様に経時的な増加傾向を示した (Fig. 18)。各成分の新鮮重あたりの含量を比較すると、スクロースに比べ、グルコースとフルクトースが花弁に多く蓄積していた。

放射線量の測定

葉から抽出したグルコース画分、スクロース画分の放射線量は、いずれの画分も経時的な増加傾向を示した (Fig. 19A)。処理後 6-24 時間ではスクロース画分の放射線量とグルコース画分の放射線量はほぼ同程度だが、処理後 30 時間以降はグルコース画分の放射線量が常にスクロース画分の放射線量を上回った。花卉から抽出した各画分でも、処理後時間と共に放射線量は増加した。このとき、スクロース画分の放射線量が常にグルコース画分の放射線量を上回った (Fig. 19B)。

また、葉と花卉におけるグルコースとスクロースの比活性を求めた (Fig. 20)。葉において、スクロースの比活性は処理 6 時間後にかけて急激に増加し、その後はほぼ一定の値を保った。グルコースの比活性も処理 6 時間後にかけて急激に増加したが、処理 12 時間後には減少し、その後はほぼ一定の値を保った。また、スクロースの比活性がグルコースの比活性を若干上回る傾向を見せた。花卉では、スクロースの比活性はグルコースの比活性に比べ非常に大きくなった。グルコースの比活性は処理 12 時間後までは増加し、その後はあまり変化しなかった。一方、スクロースの比活性は処理 6 時間後にかけて急激に増加し、その後も増加し続けた。またこのとき、処理したグルコース溶液の比活性を求めたところ、175 cpm/mg glucose であった。

考察

葉の有無および糖処理の有無が花卉成長に与える影響

これまでに多くの研究で開花と花卉成長における糖の重要性が示されており (Ichimura et al., 2003; van Doorn et al., 1991; Yamada et al., 2009a)、グルコースやスクロースといった糖は切り花の品質改善や鑑賞期間延長に有効であることが示されている (Halvey and Mayak, 1981)。本研究でも、切り花へのグルコース処理が切り花の花弁新鮮重の増加や鑑賞期間の延長に効果があることが示された (Fig. 14)。

葉をつけた切り花の花弁新鮮重は葉を取り除いた切り花に比べ高くなり、相対成長率の減少も葉のある切り花で遅延した (Fig. 14)。またこの時、葉のある切り花の花弁中には葉のない切り花に比べて多くの量の糖が花弁に蓄積していた (Fig. 15)。花弁に運ばれた糖は浸透圧調節物質や呼吸基質として利用され、花弁細胞への吸水を促す (Ichimura et al., 2003; Yamada et al., 2009a)。従って、この糖含量の差が切り花の新鮮重や相対成長率の変化に影響を与えたと思われる。さらに切り花の葉には糖が蓄積していたことから (Fig. 16)、花弁中の糖含量の差は、葉で蓄積した糖が花弁に転流したことに起因すると思われる。以上の結果は、葉が切り花の糖代謝や品質に影響することを示している。

糖輸送経路の解析

糖の輸送経路について、切り花の生け水に RI でラベルしたグルコースやスクロースを処理した実験から、カーネーションでは茎の切り口に与えた糖の大部分は葉に移動せず直接花弁に到達するという報告がなされている (Paulin and Jamain, 1982)。しかし第 2 章の緒言で述べた通り、カーネーション以外の切り花において茎の切り口から吸わ

せた糖がどのような経路を経て花弁細胞に取り込まれているかについての報告は少ない。予想される経路としては、(i) 切り口からそのまま導管を流れて花弁に到達する経路、(ii) 切り口から導管を流れて葉に到達し、そこで転流糖に再合成され、篩管を通過して花弁に到達する経路、の2つが考えられる。本実験では **Mature Bud Stage** で収穫した切り花を **RI** でラベルした糖 (^{14}C Glucose) を含むグルコース溶液で処理し、その輸送経路を調べた。

処理を行った切り花の花弁と葉における糖含量の変化を調べたところ、葉には花弁に比べ非常に多くの量のグルコースが蓄積していた (**Figs. 17, 18**)。また、葉から抽出した糖の放射線量は花弁から抽出した糖の放射線量を大きく上回った (**Fig. 19**)。これらの結果は切り花に与えたグルコースの大部分が葉に移動していることを示している。また、これまでにバラやトルコギキョウにおいて、切り花に処理した糖の一部が切り花の葉に移動することが報告されており (**Ichimura and Shimizu-Yumoto, 2007; Markhart and Harper, 1995**)、今回の結果とも一致する。さらに、処理後6時間の時点で放射性のスクロースが検出されていることから、葉において処理した放射性グルコースからスクロースが合成されていたと考えられる (**Fig. 19**)。

次に、花弁と葉におけるグルコース、スクロースの比活性を比較した。比活性とは、「放射性同位体を含む物質の、単位質量あたりの放射線量」を意味する。葉において、グルコースとスクロースの比活性の差は最大で2倍程度だったが (**Fig. 20A**)、花弁における比活性の差は非常に大きく、処理6時間後以降、スクロースの比活性はグルコースの比活性を10倍以上上回った (**Fig. 20B**)。花弁中に存在する放射性スクロースが、茎の切り口から導管を流れて花弁に到達した放射性グルコースから合成されているのであれば、花弁におけるグルコースの比活性はスクロースの比活性を上回ることが予想される。しかし、花弁中スクロースの比活性はグルコースの比活性に比べ非常に大きかつ

た。また、このステージの花弁におけるスクロースリン酸合成酵素 (SPS) 活性は、酸性インベルターゼ活性と比較すると非常に弱いため (Kumar et al., 2007)、肥大成長中の花弁でのスクロース再合成能力はあまり高くないと考えられる。従って以上の結果は、茎の切り口に与えた糖の大部分が切り口から導管を流れて葉に到達し、そこで転流糖であるスクロースに再合成され、葉から師管を通して花弁に到達していること(ii)を示している。

花弁におけるスクロースの比活性は葉におけるスクロースの比活性を上回り、処理後上昇し続けた (Fig. 20B)。スクロースが葉から花弁へ転流しているのであれば、花弁におけるスクロースの比活性が葉におけるスクロースの比活性を上回ることはいはずである。処理液から葉に移動した放射性グルコースはまず細胞質に蓄積し、その大部分は細胞質でスクロースに変換されて花弁に転流していくと思われる。この時、葉の細胞内には多量の糖が含まれているが (Fig. 17)、それらは液胞中に蓄積していると予想される。このため、葉においては細胞全体のスクロースの比活性が細胞質の比活性に比べ低くなったと考えられる。一方、花弁細胞にはスクロースはあまり蓄積していないため (Fig. 18)、細胞全体の比活性はそのような希釈の影響を受けず、高い値を示したと推察される。

以上のように本章の研究で、切り花の葉が糖の貯蔵器官として機能するだけでなく、切り花の品質に影響を与え、また与えた糖の代謝や輸送にも関与していることが示された。切り花品質を向上させるためには、花弁中の酸性インベルターゼ活性を上昇させるなどして花弁のシンク力を高め、葉から花弁への糖の転流を促すことが必要であると思われる。

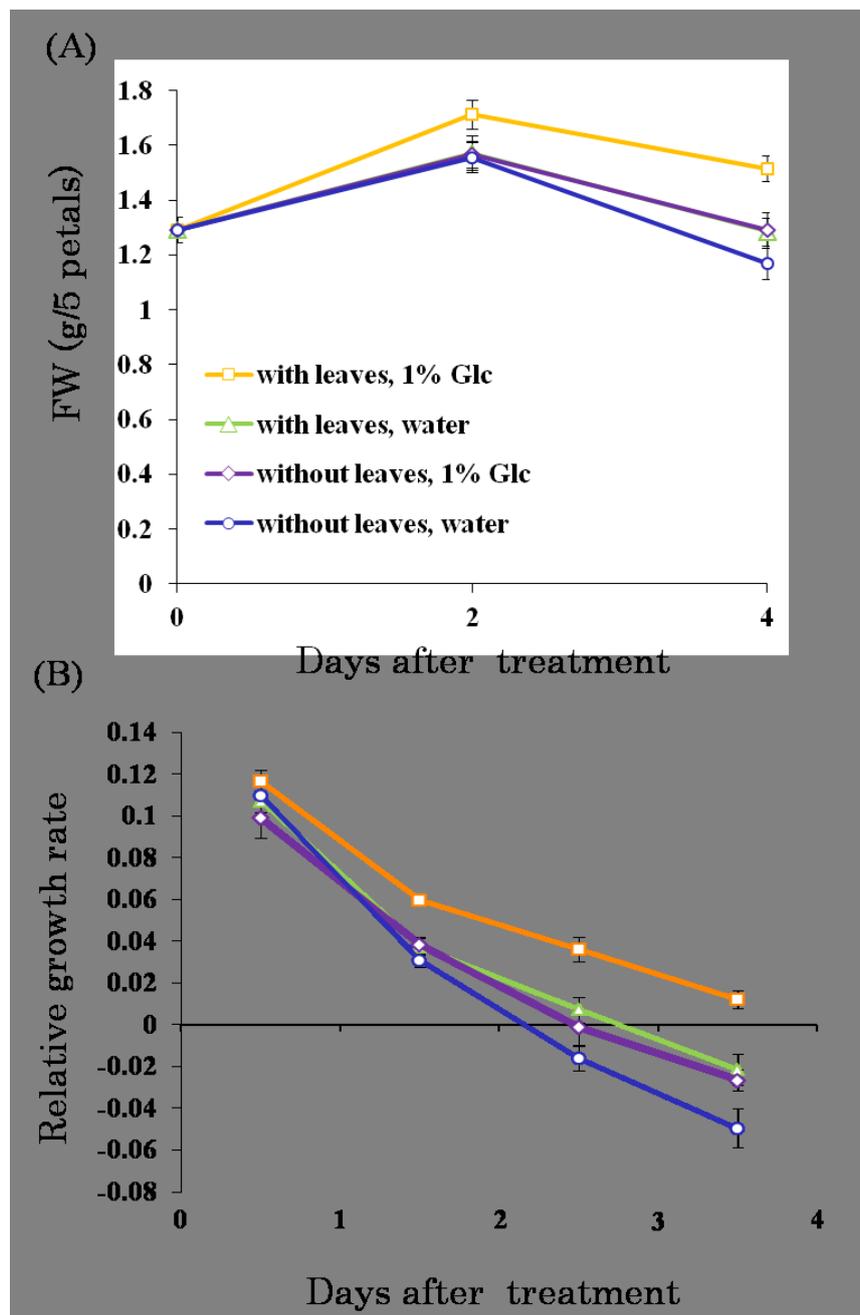


Fig. 14. Changes in the fresh weight of petals (A), relative growth rate (B) during flower opening of cut rose flower harvested at TB stage. Cut flower with leaves treated with 1 % glucose (open square), cut flower with leaves treated with deionized water (open triangle), cut flower without leaves treated with 1 % glucose (open diamond), cut flower without leaves treated deionized water (open circle) were measured. Values are means of 4 to 6 experiments \pm SE.

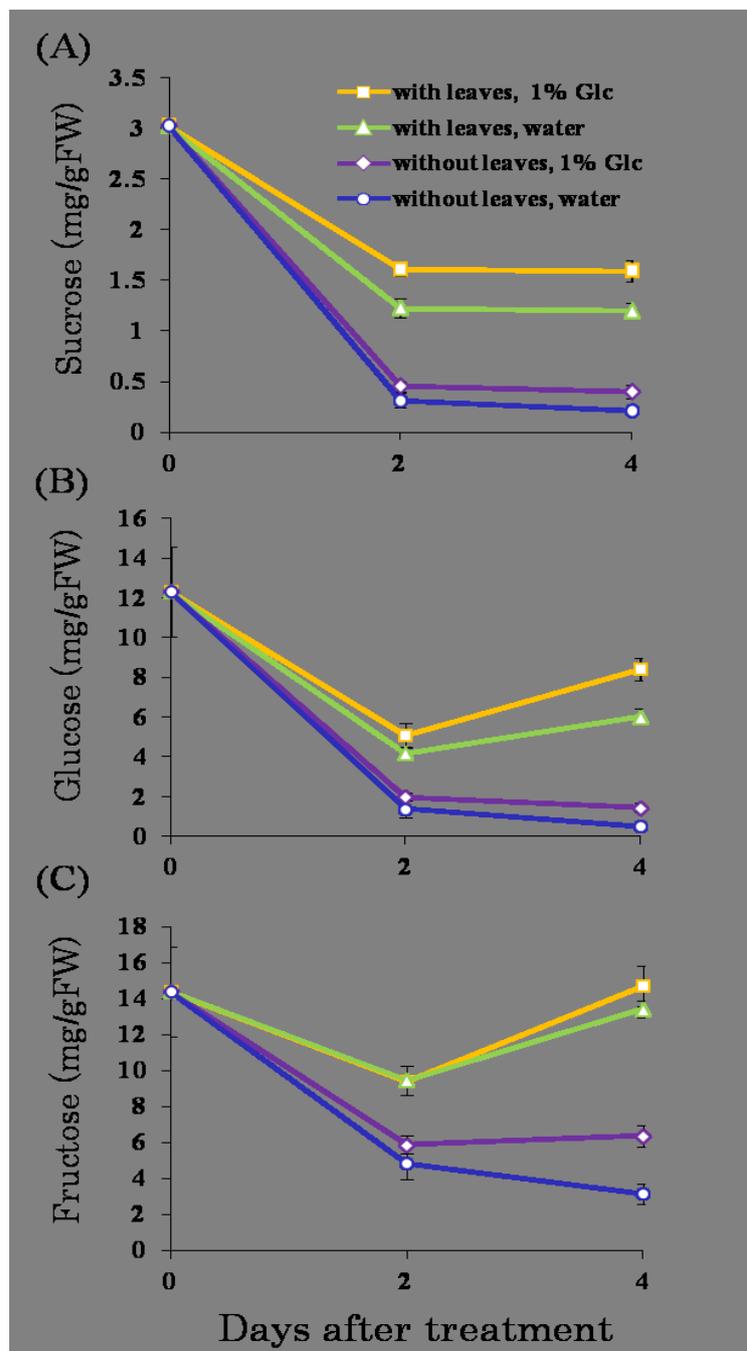


Fig.15. Changes in soluble carbohydrates in the petals during flower opening. A, Sucrose; B, Glucose; C, Fructose. Cut flower with leaves treated with 1 % glucose (open square), cut flower with leaves treated with deionized water (open triangle), cut flower without leaves treated with 1 % glucose (open diamond), cut flower without leaves treated deionized water (open circle) were measured. Values are means of 4 experiments \pm SE.

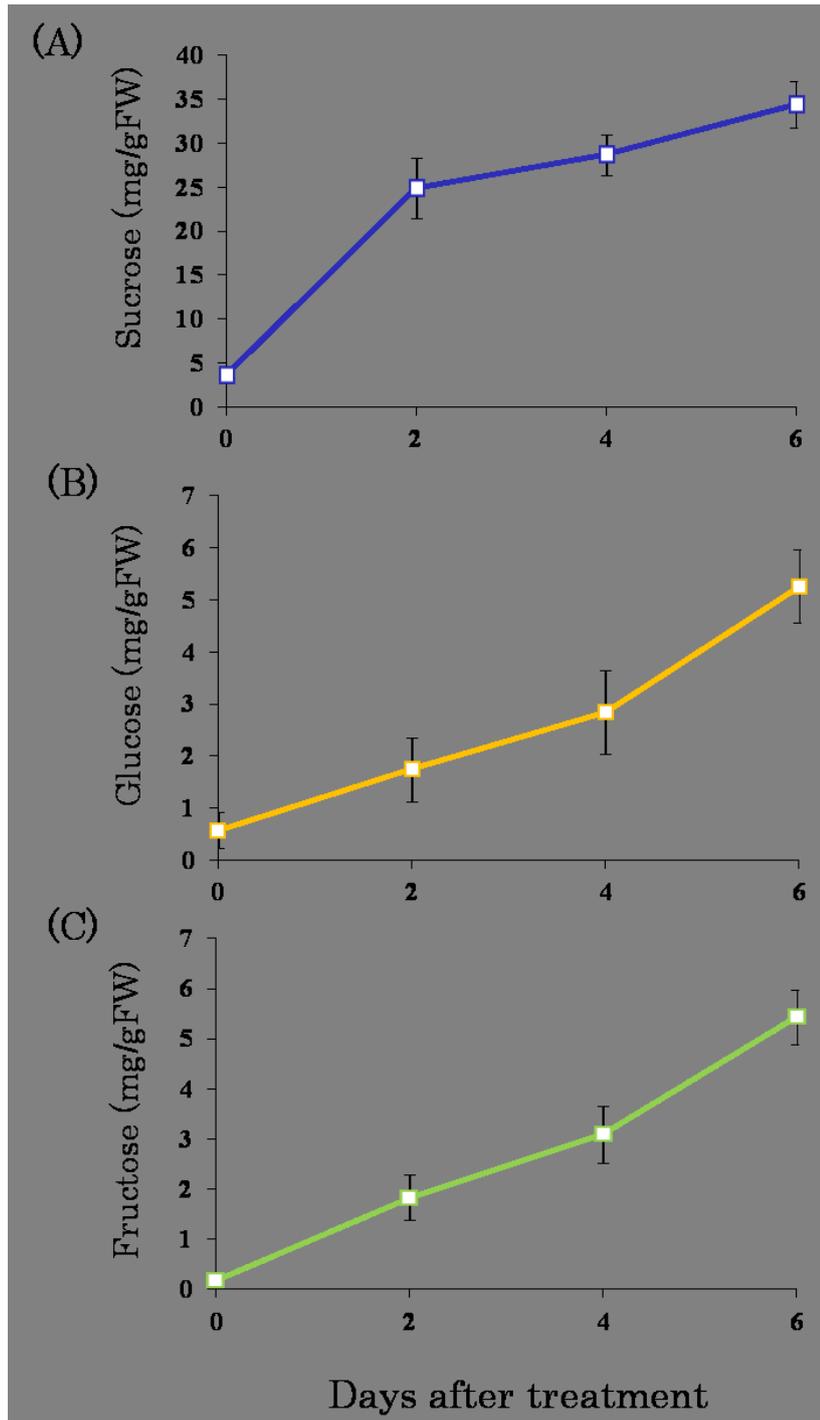


Fig. 16. Changes in soluble carbohydrates in the leaves of cut rose flower. Cut flowers were treated with deionized water after harvest. A, Sucrose; B, Glucose; C, Fructose. Values are means of 3 experiments \pm SE.

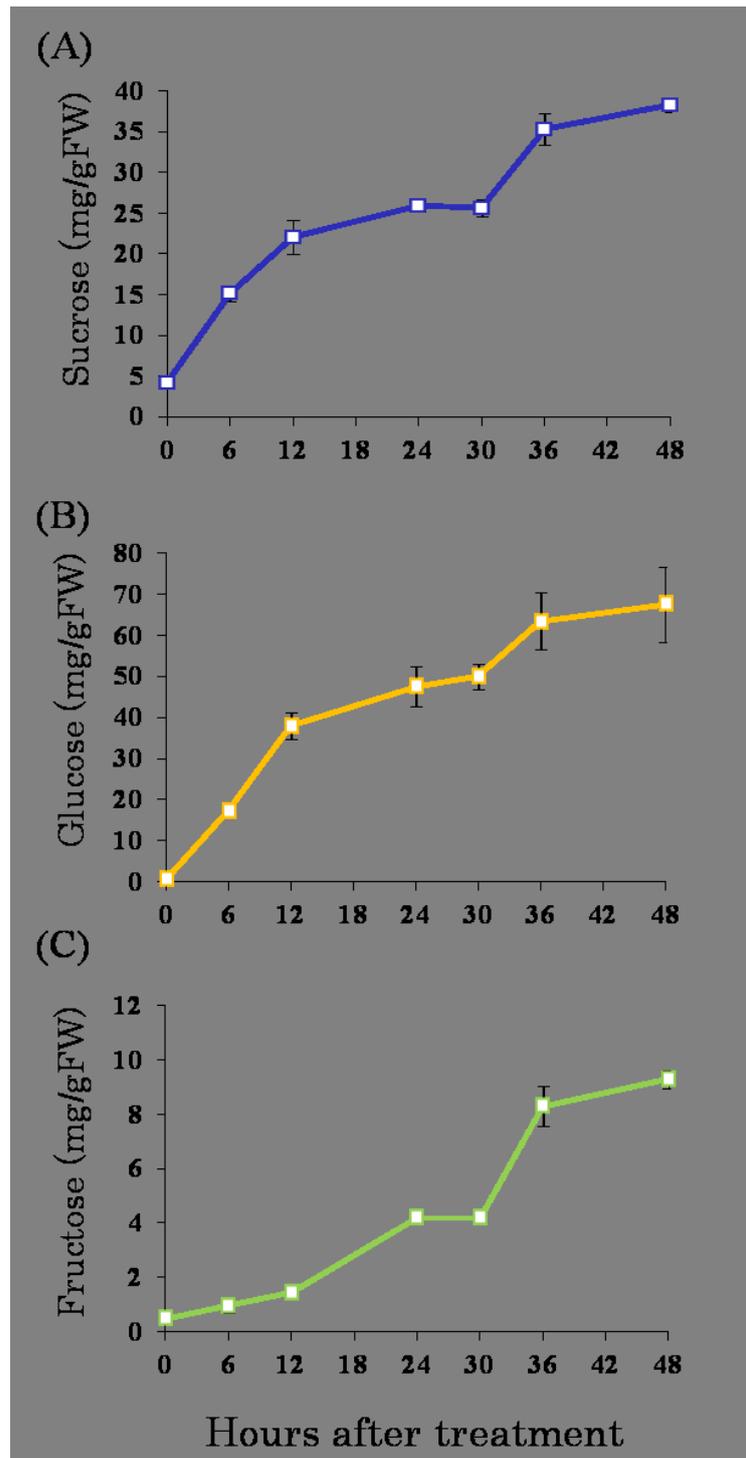


Fig. 17. Changes in soluble carbohydrates in leaves during flower opening. Cut flowers were harvested at MB stage and treated with 2% glucose. A, Sucrose; B, Glucose; C, Fructose. Values are means of 4 experiments \pm SE.

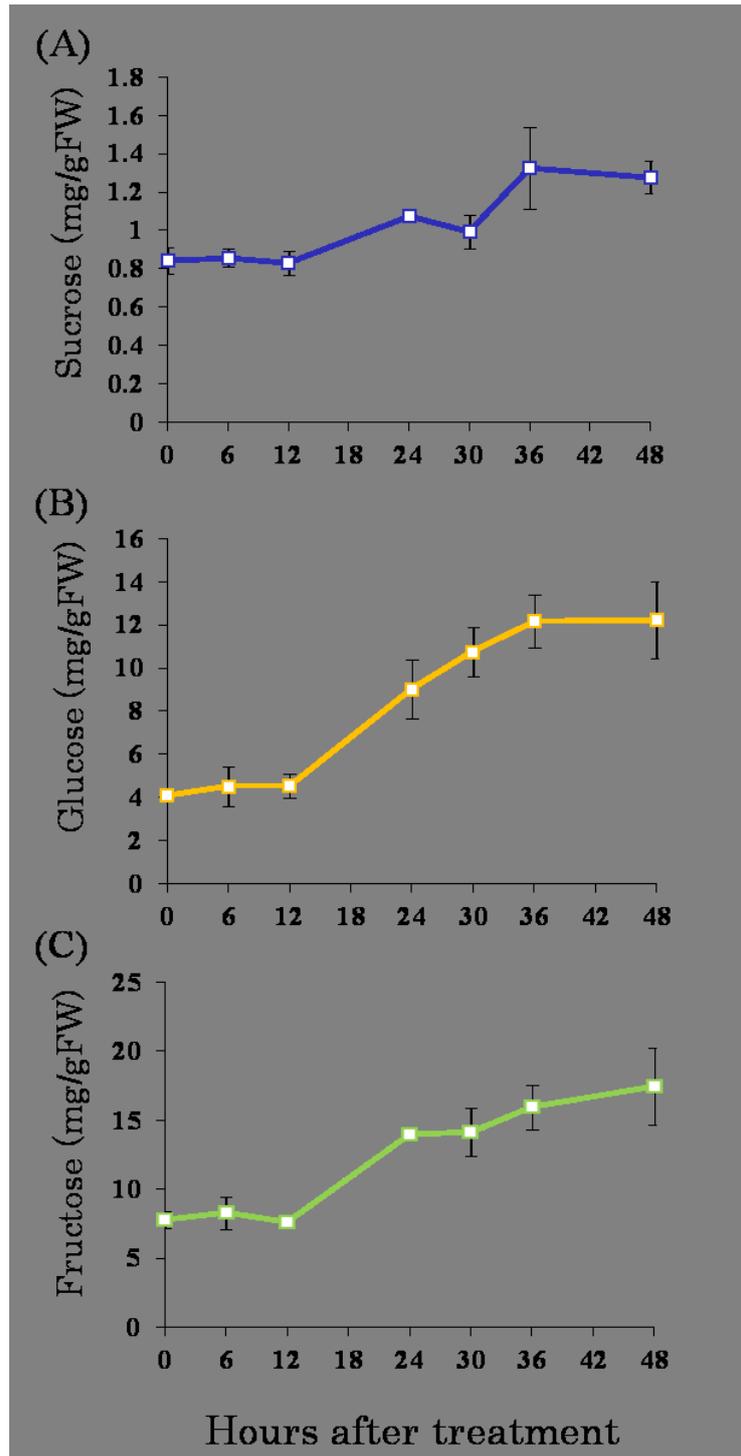


Fig. 18. Changes in soluble carbohydrates in petals during flower opening. Cut flowers were harvested at MB stage and treated with 2% glucose. A, Sucrose; B, Glucose; C, Fructose. Values are means of 4 experiments \pm SE.

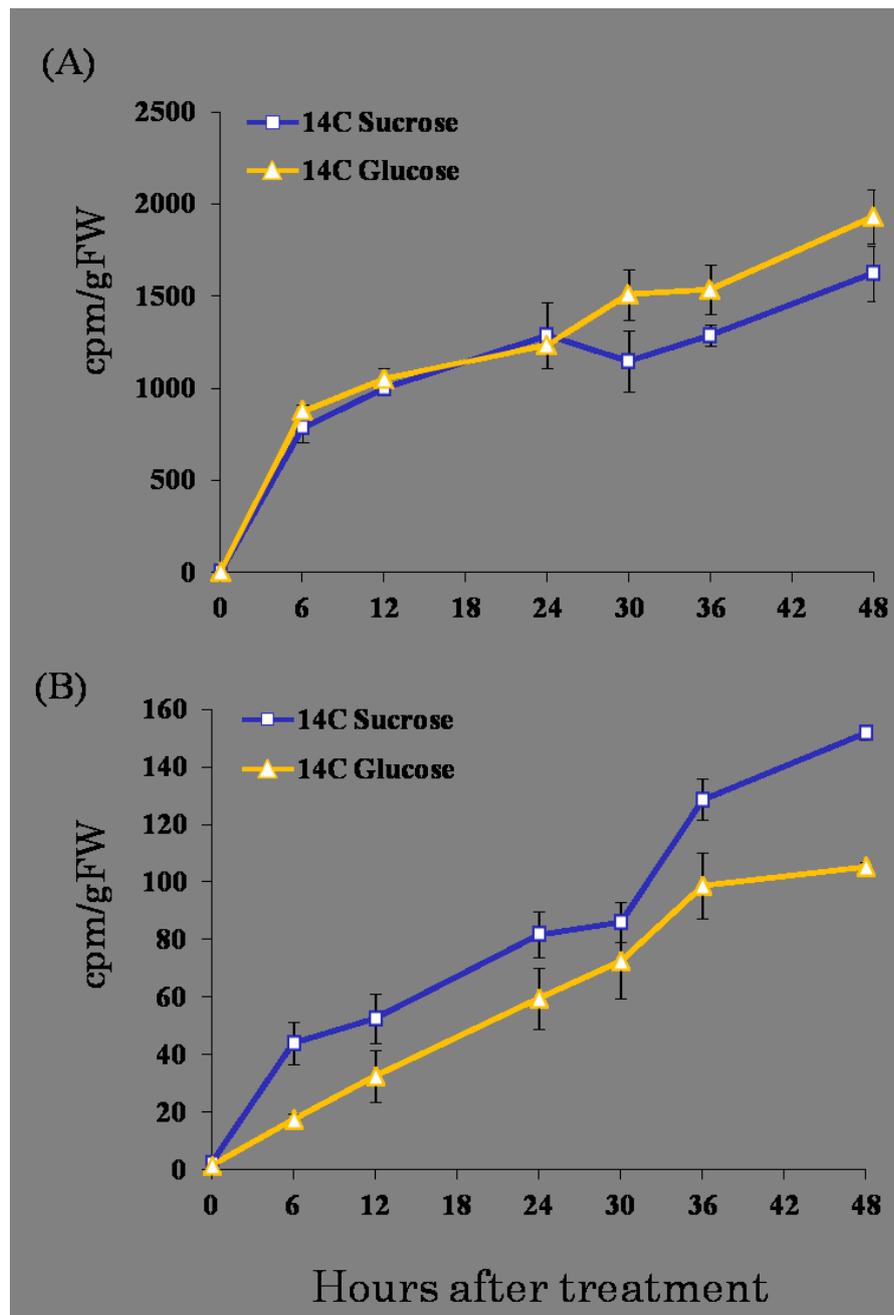


Fig. 19. Changes in radiation levels of glucose fraction (open square) and sucrose fractions (open triangle) extracted from leaves (A) and petals (B). Values are means of 3 experiments \pm SE.

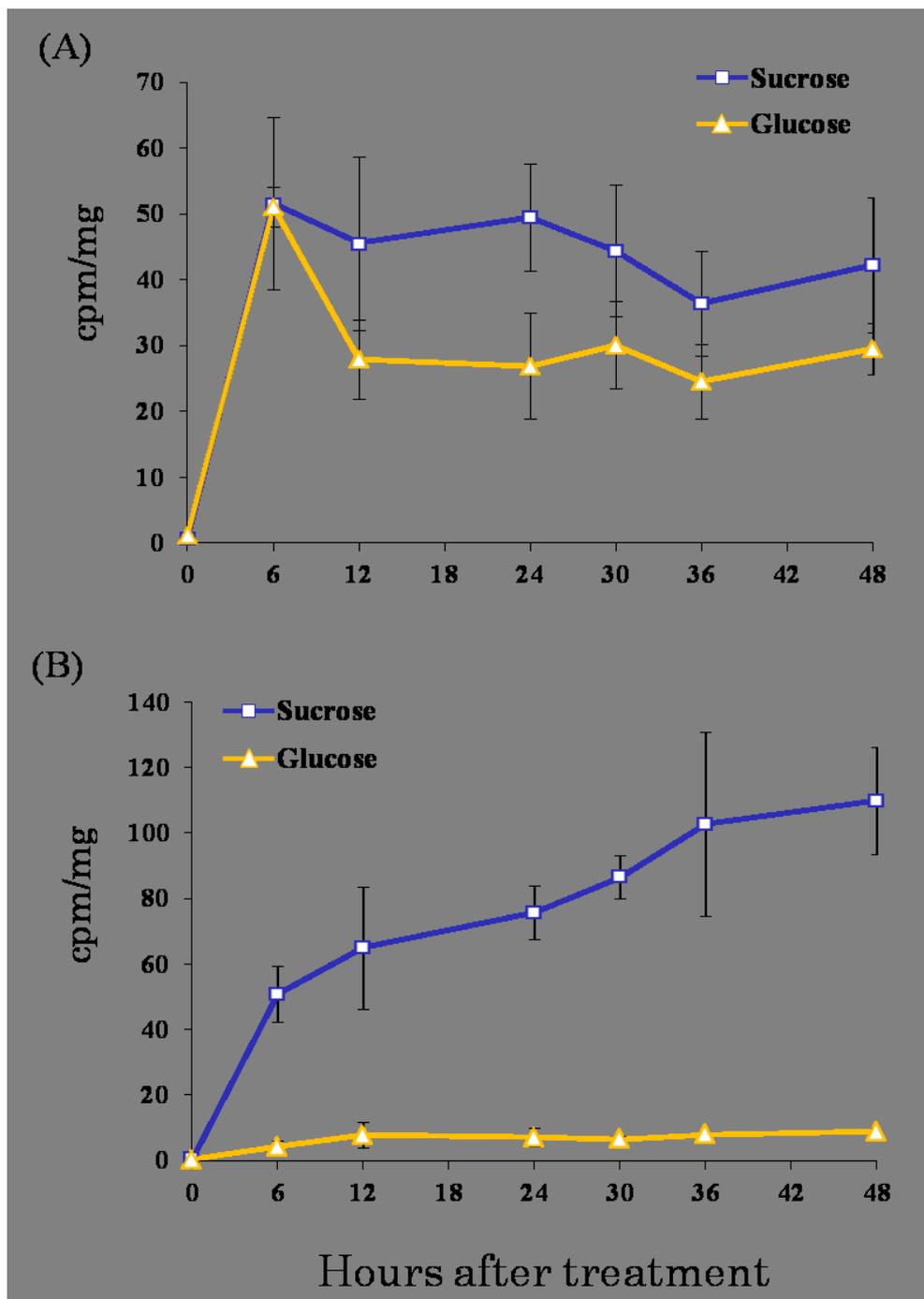


Fig. 20. Changes in specific radioactivity of glucose (open square) and sucrose (open triangle) extracted from leaves (A) and petals (B). Values are means of 3 experiments \pm SE.

要約

樹上の花では花弁中のインベルターゼ活性が上昇しヘキソースの蓄積を起こし、浸透圧上昇による吸水を促していると思われる。しかし、切り花の花弁中ではインベルターゼ活性の上昇が抑えられ、樹上の花ほど新鮮重は増加しなかった。これは、採花のために樹体からの糖の供給が失われたことと、インベルターゼ活性の減少により花弁のシンク力が低下し葉からの糖の転流が減少したことが原因であると思われる。切り花の切り口から糖を吸わせても樹上の花ほどは大きく咲かせることはできない。これは茎の切り口から吸わせた糖では十分に花弁のシンク力を上昇させられないことを意味している。本章では、切り花に吸わせた糖の輸送経路を解析し、切り花における葉の役割を考察した。

葉を残した切り花では、葉を取り除いて開花させた花に比べ花弁中の糖含量が高くなっていた。切り花の葉では糖含量の経時的な増加がみられ、葉で合成された糖の一部が花弁に転流したと考えられる。次に、 ^{14}C でラベルされたグルコースを切り花に与えて糖の輸送経路を調べた。予想される経路としては、①切り口からそのまま導管を流れて花弁に到達する経路と、②切り口から導管を流れて葉に到達し、そこで転流糖に再合成され篩管を通して花弁に到達する経路、の主に2つが考えられる。本実験の結果、葉から抽出したグルコース画分とスクロース画分の放射線量は経時的な増加傾向を示した。放射性のスクロースは吸水により葉に移動した ^{14}C グルコースから合成されたと思われる。また、花弁から抽出したスクロース画分の放射線量はグルコース画分の放射線量を常に上回った。バラ花弁におけるスクロースリン酸合成酵素活性は酸性インベルターゼ活性と比較すると非常に弱いため、花弁におけるスクロース合成能力は高くないと予想される。従って以上の結果は、切り口に与えた糖の大部分が導管を流れて葉に到達し、

そこでスクロールに合成されて花卉に転流していることを示唆している。