

## *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の色素含量および抗酸化酵素活性に及ぼす紫外線の影響

趙 習コウ<sup>1\*\*</sup>・李 進才<sup>2\*\*\*</sup>・松井鑄一郎<sup>1,2</sup>・前澤重禮<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 岐阜大学連合農学研究科 501-1193 岐阜市柳戸

<sup>2</sup> 岐阜大学農学部 501-1193 岐阜市柳戸

### Effects of UV Radiation on Pigment Contents and Antioxidative Enzyme Activities in Leaves of *Cattleya* and *Cymbidium* Orchid Plants

Xiheng Zhao<sup>1\*\*</sup>, Jincal Li<sup>2\*\*\*</sup>, Shuichiro Matsui<sup>1,2</sup> and Shigenori Maezawa<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>The United Graduate School of Agricultural, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Gifu University. Yanagido, Gifu 501-1193

### Summary

*Cattleya* (*Sophrolaeliocattleya* Estella Jewel ‘Kazumura’) and *Cymbidium* (*Cymbidium* Sazanami ‘Harunoumi’) orchids were grown under strong and weak solar UV radiation for 80 days from August 1 to test the effects of radiation on foliar pigment contents and antioxidative enzyme activities in two-year-old leaves. Foliar chlorophyll and carotenoid contents in both *Cattleya* and *Cymbidium* leaves grown under strong UV radiation were lower than those under weak UV radiation. Flavonoid content in *Cattleya* leaves grown under strong UV radiation was also lower than that under weak UV radiation, but that in *Cymbidium* leaves grown under strong and weak UV radiation was the reverse. Activities of ascorbate peroxidase after 10 days and catalase from 20 to 40 days in *Cattleya* leaves exposed to strong UV radiation were higher than those grown under weak radiation. In contrast, activities of superoxide dismutase and catalase after 20 days in *Cymbidium* leaves grown under strong UV radiation were lower than those of leaves exposed to weak radiation. Thus, our results revealed that the intensity of UV radiation differently affected the leaves of antioxidative substances and enzymes activities of the two orchid species.

**Key Words:** antioxidative enzymes, *Cattleya*, *Cymbidium*, pigment content, UV radiation.

### 緒 言

植物は、長い進化の過程を経て現在の光環境に順応しながら生存している。ところが、何十億年の長い歳月をかけて地球の大気に形成されてきたオゾン層が最近の約20年という短期間に破壊されつつある(佐々木, 2000)。これにともない、地上に到達する紫外線(UV)が増加し、植物にとって光環境は厳しくなることが予想される。植物がUVや強光を受けると、細胞内で活性酸素が多く発生し、生理障害が生じる(浅田, 2000; Powles, 1984; 李ら, 2001a)。しかし、植物は生体防御機能として活性酸素を消去する抗酸化機構を備えている(Asada, 1999;

Azevedo ら, 1998; Demmig ら, 1987; 真野・浅田, 1999; Salin, 1988; 高濱, 1988)。

UVに対する耐性は植物種間で異なり、一般的にC<sub>3</sub>型光合成植物が低いとされる(Baumbusch ら, 1998; Krupa・Kickert, 1989; 野内, 1997; Teramura, 1983)。CAM型光合成植物は呼吸によって発生したCO<sub>2</sub>を昼夜にわたってリサイクリングし、過剰な還元力の蓄積を避けながら光酸化障害を回避し(野瀬, 1996)、抗酸化酵素活性はC<sub>3</sub>型光合成植物より低いレベルを示す(李ら, 2001b)。ラン科の*Cattleya*はCAM植物で、光を好み、強光を受けやすい樹上や岩に着生する着生種であり、一方、*Cymbidium*はC<sub>3</sub>植物で、樹下に生息する地生種であり、弱光を好む(Avadhani ら, 1982; 加古, 1986)。これらの植物種を強光条件下で長期間栽培したところ、*Cattleya*は*Cymbidium*より抗酸化機能からみた強光への適応性が高いことが明らかとなった(李ら, 2001a)。太陽光にはUVが含まれていることから、両植物種がUVに

2002年3月7日 受付。2003年2月13日 受理。

\*Corresponding author.

\*\*現在: 中国山西農業大学園芸学院。

\*\*\*日本学術振興会外国人特別研究員。

本報告の一部は園芸学会平成13年度春季大会で発表した。

対して抗酸化機能をどのように応答させるかを解明するため、本研究では太陽からの UV 放射照度を変えて両植物種を栽培し、葉中の色素含量および抗酸化酵素活性の変化について調査した。

## 材料および方法

### 1. UV 除去処理

ポリ塩化ビニル製の UV 透過フィルム (防霧農ビ, スカイ 8 防霧, 厚さ 0.075 mm, シーアイ化成) および UV 除去フィルム (防霧農ビ, UV カット, 厚さ 0.075 mm, シーアイ化成) を用いて風通しのよい雨よけハウス (幅 2.5 × 長さ 6 × 高さ 1.8 m, 棚面高 60 cm) をつくり、それぞれ強 UV 区および弱 UV 区とした。実験開始時の晴天日の午前 9 時に UV 照度量子モニタ (SY-103 SEIYU RIKEN, 測定波長範囲 260–400 nm, 最大感度波長 375 nm) によって測定した UV 放射照度は強 UV 区  $2.43 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 弱 UV 区  $0.15 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  であり、可視光の遮光率は両処理区とも 18% であった。本実験には、株分け繁殖で鉢当たり 3 本植えにした後、UV 透過フィルムと黒色寒紗で遮光率を 50% にしたプラスチックハウス内 (実験開始前の晴天日の午前 9 時に測定した UV 強度は  $1.80 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) で 2 年間育てた *Sophrolaelio Cattleya* Estella Jewel 'Kazumura' (以下 *Cattleya* とする) および *Cymbidium* Sazanami 'Harunoumi' (以下 *Cymbidium* とする) を供試した。8 月 1 日に各処理区に両植物種それぞれ 15 鉢を搬入し、10 月 20 日まで 80 日間の処理を行った。処理開始時、処理 10、20 日目およびその後の 20 日間ごとに各植物種の 4 鉢について、2 年生の葉を *Cattleya* では鉢当たり 1 枚、*Cymbidium* では鉢当たり 2 枚採取し、速やかに細断して、2 g ずつ秤量し、液体窒素で凍結して  $-20^{\circ}\text{C}$  に貯蔵した。凍結試料について色素含量および酵素活性を測定した。処理中 20 日間ごとの平均温度は両処理区ともに 27.4, 26.4, 23.2,  $18.3^{\circ}\text{C}$  であった。

### 2. 色素含量の測定

葉 2 g にアセトン 5 ml を加えて磨砕し、ろ過後の残渣に対して 80% アセトンで抽出を繰り返し、抽出液の 663 と 645 nm の吸光度を測定して Arnon (1949) の式により

クロロフィル含量を求めた。カロテノイドについては、クロロフィル測定後の色素抽出液にジエチルエーテルと水を加えて脂溶性色素を分離抽出し、脱水、乾固後、ジエチルエーテルで溶かし、高速液体クロマトグラフィー (L-6200 ポンプ, 日立; L-4200 UV-VIS 検出器, 日立) により定量した。カラムは Kaseisorb LC ODS-120-5 (i.d.  $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ), 移動相の酢酸エチル:アセトニトリル:メタノール比は 0–20 分で 5:10:85, 20–25 分で 20:60:20, 25–27 分で 100:0:0, 27–30 分で 50:10:40, 30–35 分 5:10:85, 流速は  $0.7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , 検出波長は 450 nm, 注入試料量は  $5.0 \mu\text{l}$  とした。β-カロテン (ナカライテスク, 京都) を標準としてビオラキサンチン, アンテラキサンチン, ルテイン, ゼアキサンチンおよび β-カロテンを含めたカロテノイドの含量を求めた。フラボノイド含量は葉を 80% エタノール中で磨砕, ろ過し, 減圧濃縮後, 石油エーテルによって脂溶性物質を 5 回繰り返し取り除き, エタノールで定容後, ルチン (ナカライテスク, 京都) を標準として  $\text{AlCl}_3$  法 (中林, 1967) によりフラボンとフラボノールを比色定量した。

### 3. 抗酸化酵素活性の測定

抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD), アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX), カタラーゼ (CAT) の抽出および活性の測定は既報 (李・松井, 2001) に従い、葉新鮮重当たりの活性を算出した。

## 結果

### 1. 色素含量への影響

*Cattleya* では、クロロフィル含量は弱 UV 区で処理 10–40 日にかけて漸次増加し、40 日目以降は強 UV 区より高い値を示した (第 1 図)。弱 UV 区のカロテノイド含量は処理 10–40 日にかけて増加したのに対し、強 UV 区では処理 10 日後には一時的に増加したが、その後減少し、処理 40 日目以降は弱 UV 区より低い値を示した。フラボノイド含量は両処理区とも処理 10 日後に減少した。弱 UV 区では 20 日後に処理開始時の含量に回復し、60 日まで強 UV 区より高い値を示した。

*Cymbidium* では、クロロフィル含量は両処理区とも減

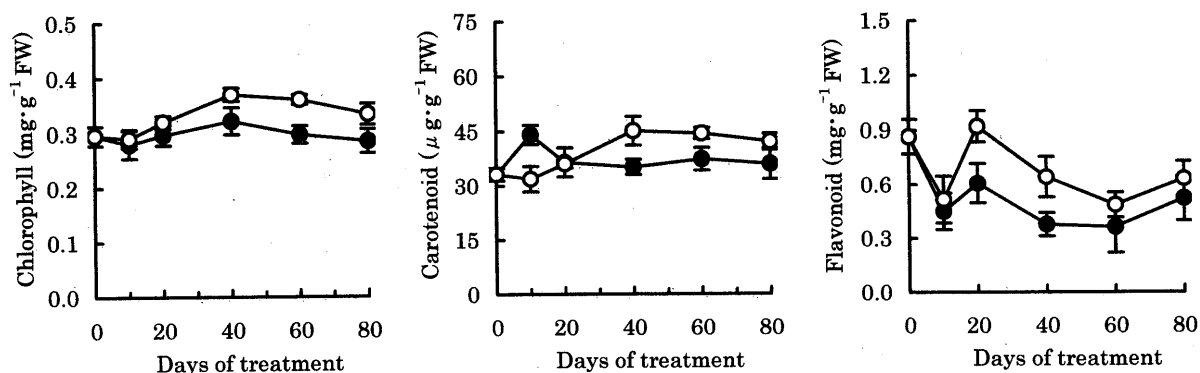


Fig. 1. Chlorophyll, carotenoid and flavonoid contents in *Cattleya* leaves grown under strong (●) and weak (○) UV radiation. Vertical bars indicate SE (n=4).

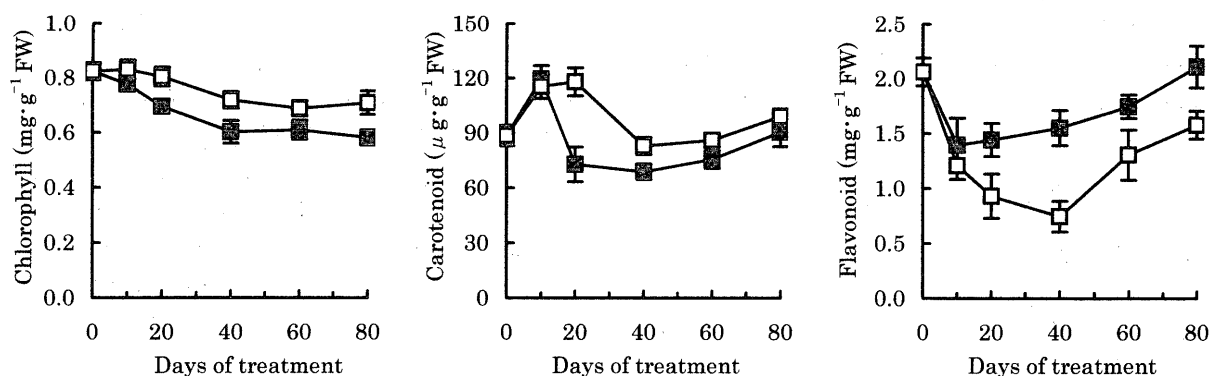


Fig. 2. Chlorophyll, carotenoid and flavonoid contents in *Cymbidium* leaves grown under strong (■) and weak (□) UV radiation. Vertical bars indicate SE (n=4).

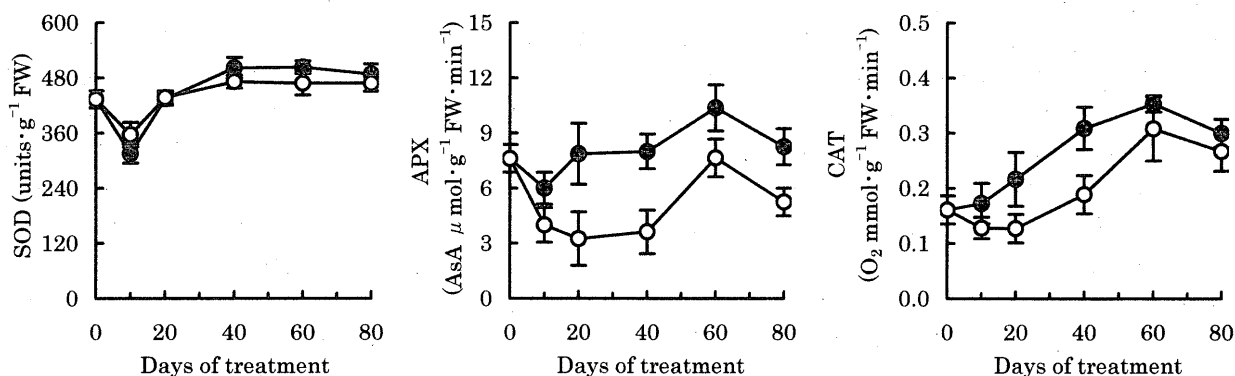


Fig. 3. Activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in *Cattleya* leaves grown under strong (●) and weak (○) UV radiation. Vertical bars indicate SE (n=4).

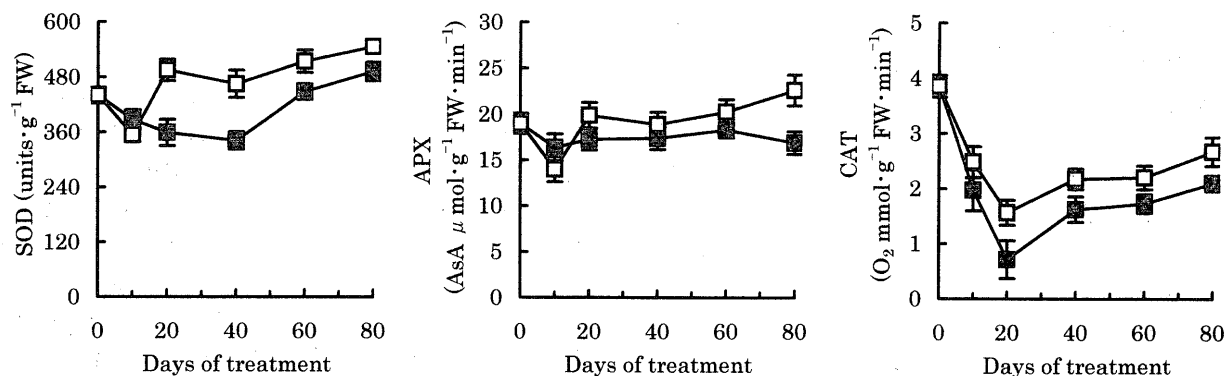


Fig. 4. Activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in *Cymbidium* leaves grown under strong (■) and weak (□) UV radiation. Vertical bars indicate SE (n=4).

少したが、強 UV 区の減少は弱 UV 区より早く始まり、処理 20 日目以降は強 UV 区の方が低い値で推移した（第 2 図）。カロテノイド含量は両処理区とも処理開始直後は増加したが、強 UV 区では弱 UV 区より早い処理 20 日後には減少し、その後は弱 UV 区より低い値を示した。フラボノイド含量は両処理区とも処理 10 日後に減少し、その後、弱 UV 区では 40 日後まで減少し続け、強 UV 区より低い値で推移した。

## 2. 抗酸化酵素活性への影響

*Cattleya* では、SOD 活性には両処理区間で差がみられず、APX 活性は強 UV 区で弱 UV 区より高い値で推移し

た。CAT 活性は両処理区で上昇したが、強 UV 区では弱 UV 区より上昇開始が早く、高い値で推移する傾向がみられた（第 3 図）。

*Cymbidium* では、強 UV 区の SOD および CAT 活性は処理 20 日目以降、弱 UV 区に比べて低い値で推移し、APX 活性も強 UV 区で低い値を示す傾向がみられた（第 4 図）。

## 考 察

UV は植物細胞内色素のフラビンなどを励起し、光増感反応によってスーパーオキシド ( $O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )

が生成され(浅田, 2000), 次いでこれらが電子移動の Haber-WeissあるいはFenton反応によって反応性のより高い1重項酸素( $^1\text{O}_2$ )やヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )の活性酸素に変化すると考えられる(小林, 1988; Yamazaki・Piette, 1990). 本実験では, 弱UV区と比べて強UV区のクロロフィルとカロテノイド含量が *Cattleya* で処理40日目から, *Cymbidium* で処理20日目から処理80日目の実験終了時まで低い値で推移した。これらの結果から, 両植物種ともクロロフィルとカロテノイドが強UVにより生じた活性酸素によって分解されたと考えられる。カロテノイドはクロロフィルに近接した位置に結合し, 3重項励起クロロフィル( $^3\text{Chl}^*$ )や $^1\text{O}_2$ を直ちに消去し, 光酸化障害を防ぐために不可欠なものとされる(浅田, 2000; Siefermann-Harms, 1987). 本実験において処理開始後, *Cattleya*の強UV区と*Cymbidium*の両処理区でカロテノイド含量が一時的に増加したことは, 遮光率50%のハウス内から遮光率18%の処理区に移した光環境の急変による光酸化障害を防御するための現象であると推測される。

フラボノイドは表皮細胞中に多く含まれ, 活性酸素や脂質ラジカルを消去する抗酸化作用を有し(高濱, 1988), 光吸収極大がUV領域にあり, UV遮光色素として植物をUV障害から防護していると考えられ, UV耐性はその含量と関連があることが指摘されている(浅田, 2000; Heldt, 2000; 熊谷, 1994; Trocineら, 1981). また, フラボノイドの生合成がUVによって促進されることが報告されている(菅野, 1980; Logemannら, 2000). 本実験では, フラボノイド含量は両植物種とも処理10日後に減少した後, *Cattleya*では強UV区は弱UV区に比べて低い値を示したが, *Cymbidium*の強UV区では処理20日目以降弱UV区よりも高い値を示した。このような含量変化の植物種による違いは, 強UVに対する生体防御機構としてのフラボノイドの役割が両植物種では異なっていることを示唆している。

$\text{O}_2$ はSODにより不均化されて $\text{H}_2\text{O}_2$ となり,  $\text{H}_2\text{O}_2$ はAPXやCATにより $\text{H}_2\text{O}$ へと無毒化される。植物を障害が生じないレベルのUVに馴らしておくと, UVへの耐性を獲得し, 活性酸素を消去するSOD, APXおよびCATなどの活性化や合成促進が起こる(浅田, 2000; Baumbuschら, 1998; 手塚, 1991). これらのことと本実験で得られた*Cattleya*のAPX, CAT活性が強UV区で弱UV区よりも高かった結果を合わせて考察すると, CAM植物である*Cattleya*では, これらの抗酸化酵素の強UVによる活性化や合成促進が起こり, UVに対する耐性増強に寄与していると考えられる。一方,  $\text{C}_3$ 植物の*Cymbidium*では, 強UV区のSOD, CAT活性は処理20日目以降, 弱UV区より低い値で推移したことから, これらの抗酸化酵素活性は強UVによって抑制されやすいことが示唆される。

以上のように, 異なるUV条件における色素含量と抗酸化酵素活性の変化から, 両植物種のUVに対する抗酸化機能の応答性が異なることが明らかとなり, *Cattleya*は抗酸化酵素が, *Cymbidium*はフラボノイドが積極的に関与することが示唆された。しかし, 両植物種のUV耐性にこれらの抗酸化機能の応答性がどの程度寄与しているかを明らかにするには, UV放射照度による生育変化の検討が必要である。

また, 両植物種の抗酸化物質含量と抗酸化酵素活性を比較すると, *Cymbidium*は全期間にわたって*Cattleya*より高い値を示し, 李・松井(2001)および李ら(2001a, b)の結果と一致した。葉緑体は通常環境下でも活性酸素を発生し, 植物細胞内の最大の活性酸素発生源である(真野・浅田, 1999)ため, *Cattleya*よりクロロフィル含量が2倍程度高い*Cymbidium*(第1, 2図)の方が活性酸素の発生量は多いと考えられる。さらに, *Cymbidium*では*Cattleya*と異なり $\text{CO}_2$ リサイクル機能を持たないため, 過剰な還元力が蓄積しやすいこと, および*Cattleya*より表皮細胞の発達程度が低く, UVや強光による障害を受けやすいことから, 活性酸素生成量が*Cattleya*より多いと考えられる。これらの活性酸素への対応策として, 高レベルの抗酸化物質含量および抗酸化酵素活性を有していることが推測される。

## 摘 要

*Cattleya* (*Sophrolaelio**Cattleya* Estella Jewel 'Kazumura')と*Cymbidium* (*Cymbidium* Sazanami 'Harunoumi')をUV透過性の異なる2種類のビニールフィルム被覆下(強UV区および弱UV区)で8月1日から80日間栽培し, 2年生葉の色素含量および抗酸化酵素活性の変化に及ぼす太陽光のUV放射照度の影響を検討した。葉中のクロロフィルとカロテノイド含量は, *Cattleya*では処理40日目以降, *Cymbidium*では処理20日目以降, 強UV区において弱UV区より低い値で推移した。フラボノイド含量は, *Cattleya*では処理20日目以降, 強UV区より弱UV区で高い傾向にあったが, *Cymbidium*では逆に処理20日目以降, 強UV区の方が高い値を示した。*Cattleya*では弱UV区に比べて強UV区のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)活性は処理10日目以降, カタラーゼ(CAT)活性は処理20~40日にかけて高い値で推移した。一方, *Cymbidium*ではスーパーオキシドジスムターゼおよびCAT活性は弱UV区より強UV区で処理20日目以降低い値で推移し, APX活性も強UV区で低い値を示す傾向がみられた。以上の結果より, 強UV条件が色素含量および抗酸化酵素活性に及ぼす影響は両植物種で異なり, UV放射照度に対する両植物種の抗酸化機能の応答性の違いが示唆された。

## 引用文献

- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 601-639.
- 浅田浩二. 2000. 植物の葉はなぜ日焼けをしないのか. p. 36-50. 市橋正光・佐々木政子編. シリーズ・光が拓く生命科学. 第4巻. 生物の光障害とその防御機構. 共立出版社. 東京.
- Avadhani, P. N., C. J. Goh, A. N. Rao and J. Arditti. 1982. Carbon fixation in orchids. In: J. Arditti (ed.). Orchid biology-reviews and perspectives, II. p. 173-193. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- Azevedo, R. A., R. M. Alas, R. J. Smith and P. J. Lea. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. Physiol. Plant. 104: 280-292.
- Baumbusch, L. O., M. Eiblmeier, J.-P. Schnitzler, W. Heller, H. Sandermann, Jr. and A. Polle. 1998. Interactive effects of ozone and UV-B radiation on antioxidants in spruce (*Picea abies*) and pine (*Pinus sylvestris*) needles. Physiol. Plant. 104: 248-254.
- Demmig, B., K. Winter, A. Kruger and F. C. Czygan. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. Plant Physiol. 84: 218-224.
- Heldt, H. W. 2000. 植物生化学 (金井龍二訳). p. 343-358. シュプリンガー・フェアラーク東京. 東京.
- 加古舜治. 1986. カトレア類・シンビジウム. p. 562-582. 阿部定夫・岡田正順・小西国義・樋口春三編. 花卉園芸の事典. 朝倉書店. 東京.
- 小林一雄. 1988. 活性酸素の寿命とその生理的意義. p. 26-31. 中野 稔・浅田浩二・大柳善彦編. 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構. 共立出版社. 東京.
- Krupa, S. V. and R. N. Kickert. 1989. The greenhouse effect: Impacts of ultraviolet-B (UV-B), carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), and ozone (O<sub>3</sub>) on vegetation. Environ. Pollut. 61: 263-293.
- 熊谷 忠. 1994. イネと紫外線. UV-Bの影響を中心に. 化学と生物. 32: 506-513.
- 李 進才・松井鑄一郎. 2001. 低温処理が *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性に及ぼす影響. 園学雑. 70: 360-365.
- 李 進才・趙 習コウ・松井鑄一郎. 2001a. 光ストレスおよび遮光栽培における *Cattleya* と *Cymbidium* 葉の抗酸化酵素活性および色素含量の変化. 園学雑. 70: 372-379.
- 李 進才・趙 習コウ・松井鑄一郎. 2001b. C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> および CAM 植物における過酸化水素含量と抗酸化酵素活性の差異. 園学雑. 70: 747-752.
- Logemann, E., A. Tavernaro, W. Schuiz, I. E. Somssich and K. Hahlbrock. 2000. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 1903-1907.
- 真野純一・浅田浩二. 1999. 光酸素ストレスを回避する分子機構. 蛋白質 核酸 酵素. 44: 2239-2245.
- 中林敏夫. 1967. 植物性色素の変色・フラボノイド色素. p. 3-33. 中林敏夫・木村 進・加藤博通編. 食品の変色とその化学. 光琳書院. 東京.
- 野瀬昭博. 1996. CAM型光合成の進化的側面. 生環調. 34: 97-104.
- 野内 勇. 1997. 紫外線 (UV-B) 増加は農作物の生長・収量に影響を及ぼす [2]. 農および園. 72: 685-690.
- Powles, S. B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 15-44.
- Salin, M. L. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. Physiol. Plant. 72: 681-689.
- 佐々木政子. 2000. オゾン層破壊と地表の太陽紫外線. p. 1-16. 市橋正光, 佐々木政子編. シリーズ・光が拓く生命科学. 第4巻. 生物の光障害とその防御機構. 共立出版社. 東京.
- Siefermann-Harms, D. 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. Physiol. Plant. 69: 561-568.
- 菅野延彦. 1980. 光化学反応による色素形成. p. 373-378. 林 孝三編. 植物色素. 養賢堂. 東京.
- 高濱有明夫. 1988. 活性酸素の消去・低分子化合物・フラボノイド. p. 342-347. 中野 稔・浅田浩二・大柳善彦編. 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構. 共立出版社. 東京.
- Teramura, A. H. 1983. Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. Physiol. Plant. 58: 425-430.
- 手塚修文. 1991. 紫外線による植物の生長促進作用. 蛋白質 核酸 酵素. 36: 1941-1945.
- Trocine, R. P., J. D. Rice and C. N. Wells. 1981. Inhibition of seagrass photosynthesis by ultraviolet-B radiation. Plant Physiol. 68: 74-81.
- Yamazaki, I. and L. H. Piette. 1990. ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe<sup>2+</sup> ions with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reactive species in oxygen toxicity in biology. J. Biol. Chem. 265: 13589-13594.