

植物における遅延蛍光の測定 — ストレス因子のモニタリング方法

Manfred Hennecke€; Bernd Hutter€; Angela Br ux€*

€ Communicated by BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Calmbacher Str. 22, D-75323 Bad Wildbad, Germany

*Address all correspondence to: angela.br ux@berthold.com

- 植物のストレス状態測定の方法としての遅延蛍光
- 真菌の感染と乾燥耐性

【要約】

遅延蛍光はクロロフィル含有量だけでなく、真菌の感染や高い塩濃度、干ばつのような環境的な影響で変わる植物の生理状態の指標としても働く。

この研究において我々はストレス因子をモニタリングする方法として植物の *in vivo* イメージングのために遅延蛍光を使った。

【紹介】

光合成において光は光化学系 II の中に吸収される。“特別ペア (special pair)” クロロフィル a (P680) からなる励起反応中心 P680 は、フェオフィチン (Pheo) を還元し、電子をプラストキノン (PQ) に、さらにカスケード下流の光化学系 I の方へ移動させる。光化学系 I の光励起後、電子は NADPH になる。並行してプロトン勾配を形成して ATP 産生のために使われる (図 1)。

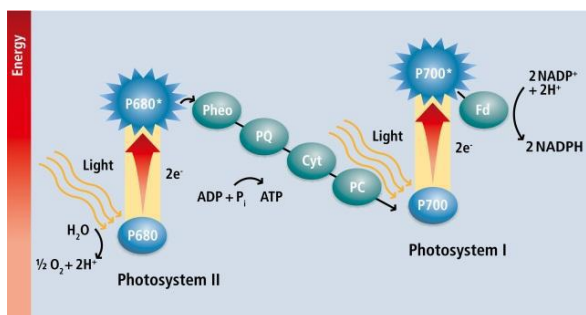


図 1 : 光化学系 II から光化学系 I へ流れる電子の仕組み

クロロフィル蛍光は植物が光合成のために光合成器官で集め利用しきれなかった余分な光エネルギーを消失させる方法のひとつである。遅延蛍光は残光とも呼ばれ、予め光を照射された損傷を受けていない植物によって発される極めて弱い光である。それは、光合成の反応に密接に関連する光合成的な生物²(レビュー³)内の至る所にありそしてよく研究されたプロセスである。

遅延蛍光は即時蛍光とそっくり同じ放出波長でクロロフィル a 分子によって放出される。

即時蛍光のシグナルはナノ秒しか保てないのに対し、遅延蛍光は数秒～数分後でも検出することができる。おそらく励起 PQ(プラストキノン)と光化学系 II の P680 の間で電荷が再結合した結果、イルミネーションフォトンの最後に発光すると考えられる。

遅延蛍光は蛍光発光のほんの小さな一部分を表すだけだが、植物におけるストレス反応研究に強力な手段となる。

除草剤や病原体、その他のストレス因子は葉緑体に作用することによって遅延蛍光反応を変える。

従って遅延蛍光のカイネティクス測定はストレス因子の影響を調べ、用量-反応曲線(線量効果曲線)を得るための速くて簡単な方法である。ここで我々は植物のストレス因子のモニタリングシステムとして遅延蛍光とその値で真菌の感染と乾燥の影響を研究する。

【実験手順と機器の設定】

1. 真菌感染

遅延蛍光は真菌の感染 8 日後のトマトの葉で測定した。

葉は円形に切って 24well プレートの中に入れ LED パネルで 30 秒間光を照射した。

4×4のピクセルビニングで露光時間を20秒に設定した Berthold Technologiesの NightSHADEを使い、光のスイッチを切った後ただちに遅延蛍光を測定した。

光の強度はソフトウェア indiGO™ でカウント/秒 (cps)に変換された (図 2)。

2. 乾燥耐性

大豆の苗木に LED パネルで 30 秒間光を当てた後、光を消して 4×4 のピクセルビニング・露光時間 30 秒の設定で NightSHADE を用い、ただちに遅延蛍光を測定した。

それに続いて半分の苗木には乾燥状態を保ちもう一方の苗木には十分な水を与えて、2 日後再びこの苗木を測定した。

光の強度はソフトウェア indiGO™ でカウント/秒 (cps)に変換された (図 2)。

【材料】

- NightSHADE LB 985 (図3)
- LED パネル
- 24 well マイクロプレート

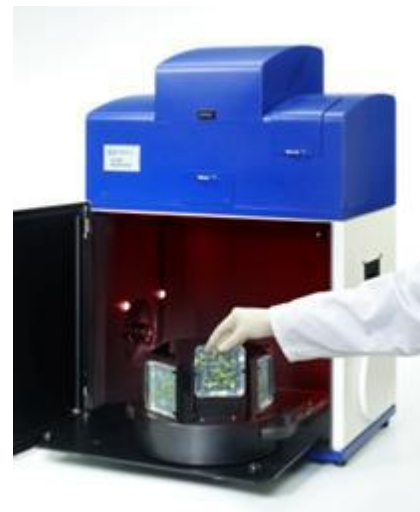


図 3 : 植物イメージングシステム NightSHADE LB 985

【結果】

1. 真菌感染

無処理のトマトの葉はクロロフィル含有量の直接的な指標として遅延蛍光の強いシグナルを示したのに対して、真菌が感染した葉では少しの遅延蛍光シグナルも見られなかった (図 4)。

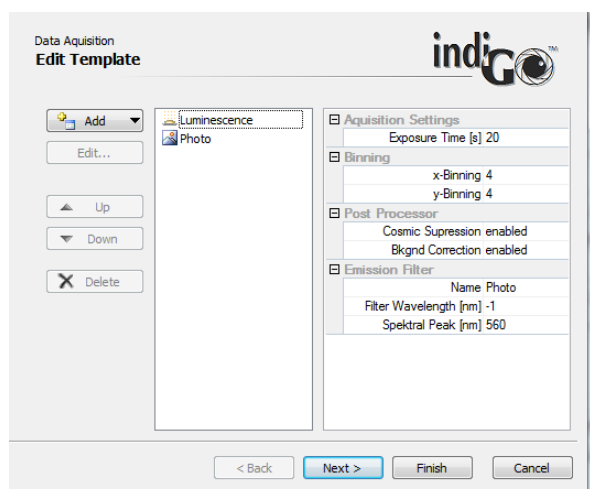


図 2 : ソフトウェア indiGO™ における機器の設定
: 定義された設定による遅延蛍光のためのテンプレート

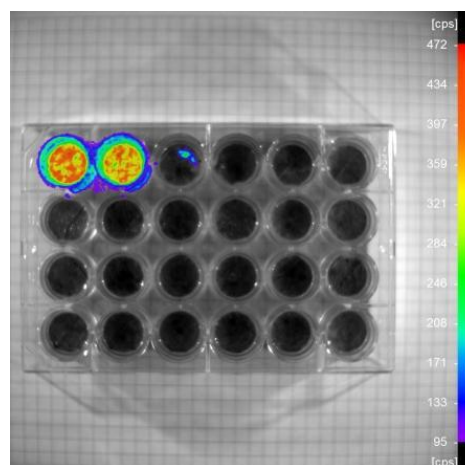


図 4 : 真菌感染後トマトの葉の遅延蛍光

A1,A2well : 無処理の葉、A3~D6 : 真菌感染から 8 日後の葉。クロロフィルが破壊されたため遅延蛍光は見られない。

2. 乾燥耐性

乾燥に影響された大豆苗木の遅延蛍光は減少したのに対して、十分水の与えられた苗木は遅延蛍光イメージングにおいて、2日前と同じシグナルの強さを示した(図5)。

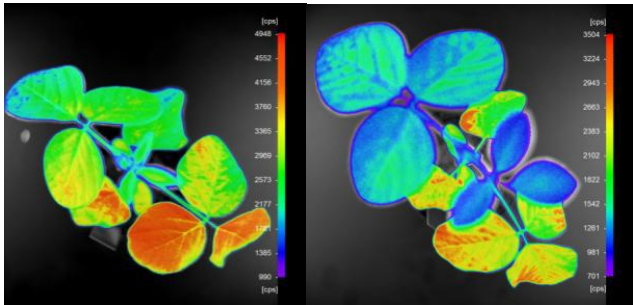


図5：乾燥ストレス後の大豆苗木の遅延蛍光

左：十分な水を与えた苗木、右：乾燥させて2日後の同じ苗木における遅延蛍光。赤色は高いクロロフィル含有量を表す高い強度を示し、青色は低量のクロロフィルを表した低い蛍光強度を示している。

【結論】

遅延蛍光の測定は *in vivo* で植物の生育力を推定できる簡単かつ迅速な方法である。

我々の実験で、光合成器官の生理的な状態は、真菌の感染または乾燥のどちらにも影響を受けた。

どちらのケースでもクロロフィルの生存力が損なわれ数が減ることによって、クロロフィル遅延蛍光も減少し、無くなる結果となった。

遅延蛍光は植物の除草剤¹、ホルモン、サーカディアンリズム²、成長抑制剤やその他のストレス因子の影響を調べるのに大いに役立つ。さらに遅延蛍光は除草剤¹のような抑制因子の植物用量-反応曲線を測定するのにも簡単かつ迅速な手段でもある。

REFERENCES

¹Strasser: Delayed fluorescence as a Screening Tool <http://www.bio21.bas.bg/ibf/lambrev/df/>

²Gould et al. (2009): Delayed fluorescence as a universal tool for the measurement of circadian rhythms in higher plants. The Plant Journal 58: 893-901

³Jursinic (ed.) (1986): Delayed Fluorescence: Current Concepts and Status. New York: Academic Press