

植物の葉の新旧による元素含量の違い —大気 PIXE による測定—

河合成直¹、茂泉翔平¹、後藤祥子²、世良耕一郎³

¹ 岩手大学農学部 020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

² 日本アイソトープ協会滝沢研究所 020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-1

³ 岩手医大サイクロトロンセンター 020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1. はじめに

本研究は加速器から照射されるプロトンビームを用いる粒子線励起 X 線分析法 PIXE (Proton Induced X-Ray Emission)を用いて、植物の元素を非破壊で定量した¹⁾。この方法は、灰化した植物試料を用いて行われる真空 PIXE による方法とは異なる。本研究においては無標準法²⁾を基礎とし、生きた植物に対する無標準定量分析^{3,4,5)}を行った。本実験においては、光合成と元素との関わりに着目し、光合成における光化学系Ⅱに関与する水分解酵素には Mn が必須である⁶⁾ことより、植物の葉の Mn の含量と光合成活性との関わりを検討することとした。

2. 実験方法

ブロッコリーの栽培法

本研究では、ブロッコリー (*Brassica oleracea* 品種名 ハイツ SP タイキ種苗株式会社) を供試作物とし、以下の手順で水耕栽培した。栽培は岩手大学のガラス温室で行った。

(1) 播種・育苗

10 L 容の浅い容器にパーライトを敷き詰め、ブロッコリーの種子を播種し、その上にパーライトを用いて覆土した。その後、水道水を与えた。さらに、2 日に 1 回程度、水道水を与えた。子葉が開き始めたら、水道水のかわりに 1/5 濃度の Arnon & Hoagland No. 2⁷⁾ を改変した培地を 2 日に 1 回程度与えた。

(2) 移植・本培養

苗の第 1 本葉が出た段階で、苗を 1/5 濃度の Arnon & Hoagland No. 2 改変培地へ移植した。1 週間後に培地を 1/2 濃度の Arnon & Hoagland No. 2 改変培地に変え、本培養を開始した。Fe の供給源として EDTA-Fe 錯体ではなく FeCl₃ を用いた。また、この培地においては Mn 欠乏を誘導しやすくするために pH を 6.5 に設定しているため、高 pH で誘導されやすい Fe 欠乏症状の発生を避けるために Fe を通常用いられている濃度よりも 500 μM と高くした。栽培容器は 35 L 容のものを使い、スポンジを巻いた苗を、植物を支える板(支持板)の穴に 1 本の苗を 1 株としてスポンジで包み、25 株ずつ植えた。

この時、Mn を加えた培地に移植した区を Mn 充足区(+Mn)、Mn を加えていない培地に移植した区を Mn 欠乏区(-Mn)とした。栽培容器は他金属の混入を防ぐため、0.1 N 塩酸を 24 時間以上満たし、除金属処理を行った。

培地の更新は、1週間に1度行った。デジタル pH メーターを用いて培地 pH 6.5 に調節し、1 N の HCl と NaOH を用いてこれを維持するよう努めた。水位は脱イオン水を加えて維持し、水耕栽培中はエアポンプを用いて通気を行った。なお、水耕栽培はオルガノ株式会社製のモノベット型イオン交換器を用いて得た、電気伝導度 0.2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以上の脱イオン水を用いて行った。

Mn 充足区のブロッコリーの葉を写真 1 に、Mn 欠乏区のブロッコリーの葉を写真 2 に示した。



写真 1 Mn 充足区のブロッコリーの葉



写真 2 Mn 欠乏区のブロッコリーの葉

ダイズの育成

後述の大気 PIXE 法の供試植物として、ダイズ(*Glycine max* cv. ナンブシロメ 株式会社山清商店)を用い、以下の手順で水耕栽培した。栽培は岩手大学のガラス温室で行った。

(1) 播種・育苗

10 L 容の浅い容器にパーライトを敷き詰め、ダイズの種子を播種し、その上にパーライトを用いて覆土した。その後、水道水を与えた。さらに、2日に1回程度、水道水を与え、第一本葉が開くまで育苗した。

(2) 移植・本培養

苗の第1本葉が出た段階で、苗を 1/5 濃度の Arnon & Hoagland No. 2 改変培地へ移植した。1週間後に培地を 1/2 濃度の Arnon & Hoagland No. 2 改変培地に変え、本培養を開始した。この培地においては Mn 欠乏を誘導しやすくするために pH を 6.5 に設定しているため、高 pH で発生しやすい Fe 欠乏症状を避けるために、Fe を通常用いられている濃度よりも 500 μM と高くした。栽培容器は 35 L 容のものを用い、スポンジを巻いた苗を、植物を支える板(支持板)の穴に1本の苗を1株としてスポンジで包み、25株ずつ植えた。

この時、Mn を加えた培地に移植した区を Mn 充足区(+Mn)、Mn を加えていない培地に移植した区を Mn 欠乏区(-Mn)とした。栽培容器は他金属の混入を防ぐため、0.1 N HCl を用いて 24 時間以上除金属処理を行った。培地の更新は1週間に1度行った。その他の方法はブロッコリーと同様であった。

Mn 充足区のダイズの葉を写真 3、Mn 欠乏区のダイズの葉を写真 4 に示した。



写真3 Mn 充足区のダイズの葉



写真4 Mn 欠乏区のダイズの葉

大気 PIXE による分析法

上記の方法で、約1か月間育成したブロッコリーとダイズを岩手大学の温室内で栽培し、分析時には日本アイソトープ協会(社)仁科記念サイクロトロンセンター(NMCC)へ植物を運び、大気 PIXE を用いて分析を行った。Mn 充足区と Mn 欠乏区の両方で新葉(第6葉)と古葉(第2葉)が測定された。大気 PIXE 法におけるプロトンの照射時間は15分とした。照射される葉は、照射部位が動かないようにセロテープなどで固定した。根を小ボトル中の Arnon & Hoagland No. 2 改変培地中に保ち、水分が根から十分に供給される状態で照射が行った。大気 PIXE による分析の様子を、写真5に示した。



写真5 大気 PIXE の装置のビーム照射の部分



写真6 測定の様子(植物はブロッコリー)

蛍光分析による光合成活性測定

岩手大学温室内で水耕栽培したブロッコリーを上記の方法で別に約1か月栽培し、茎の根元から先端に向かって古い葉から新しい葉を測定した。古い葉から順にそれぞれ第1葉～第7葉と呼ぶ。その葉を葉の根元より切断し、岩手大学寒冷バイオ研究センターの二次元クロロフィル蛍光装置(PSI社製2次元イメージング・クロロフィル蛍光測定器 FluorCam 800MF)により、光合成の活性の一つである光化

学系Ⅱの中の電子の流れを反映する値として知られている Fv/Fm を測定した。この方法は、凍結耐性など植物のストレスと光合成活性との関係を検討する手法として近年用いられている^{13, 14)}。

3. 結果と考察

PIXEによる元素分析

各植物葉の Mn 濃度を、図1、図2に示した。ブロッコリー、ダイズ、いずれの植物でも新葉より古葉で高い Mn 濃度が測定された。Mn 欠乏症は、新葉から現れることが多いとされる⁸⁾。Mn 欠乏区の古葉での高い Mn 濃度は、新葉へ Mn 転流が行われにくいことを示し、Mn 欠乏症が新葉で生じやすいという現象と一致する。

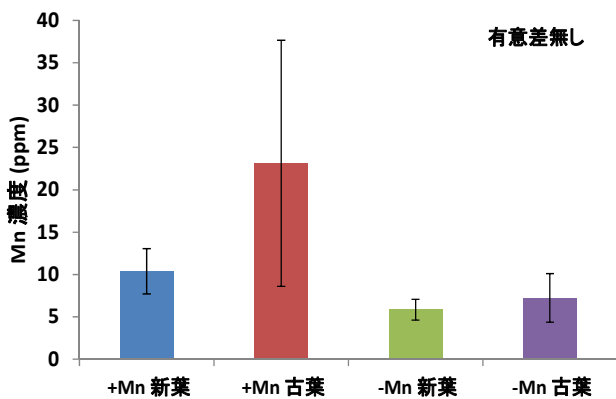


図1 ブロッコリー葉の Mn 濃度

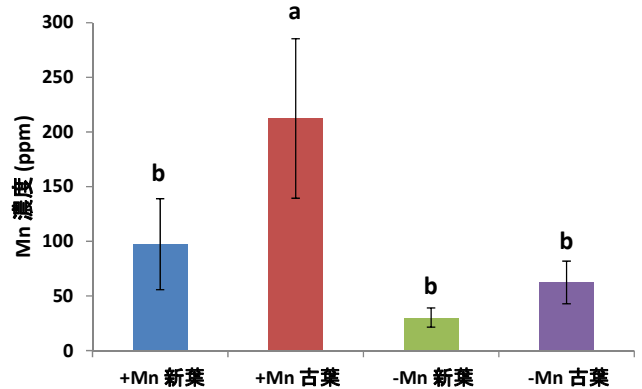


図2 ダイズ葉の Mn 濃度

各植物葉の Cl 濃度を、図3、図4に示した。全ての植物で新葉より古葉で高い Cl 濃度を示した。Cl は植物の必須元素であり、Cl は光合成の水の光分解に関与する^{6, 9)}。そのため、新葉でも光合成を行うために、Cl が存在するはずである。ブロッコリーでは、Mn 充足区と Mn 欠乏区の両方の新葉で古葉より低い Cl 濃度が検出された。ダイズ新葉の Mn 充足区と Mn 欠乏区では、Cl は検出されなかった。新葉では光合成がさかに行われており、光合成における水分解酵素に必須の元素である Cl がダイズの新葉において検出されなかったのは、興味深い。今後、このような現象について検証する必要がある。

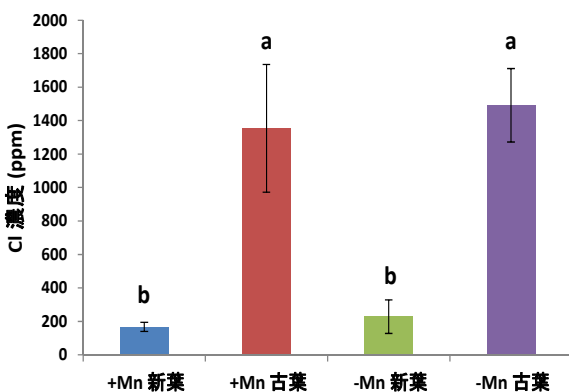


図3 ブロッコリー葉の Cl 濃度

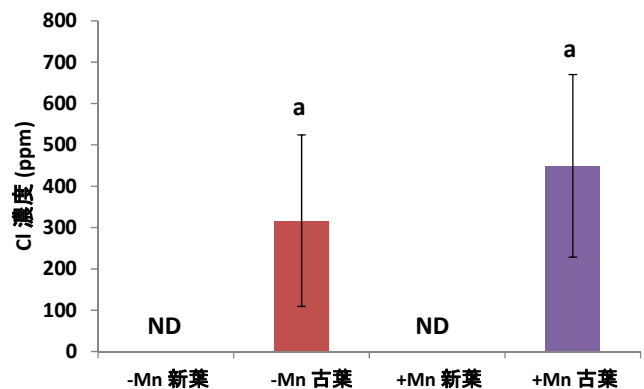


図4 ダイズ葉の Cl 濃度

各植物葉の Mn と Cl 以外の元素濃度を、図5～16に示した。Fe 濃度はブロッコリーでは新葉と古葉に大きな違いは見られなかったが、ダイズでは新葉よりも古葉で高い濃度となった。Cu 濃度は、Mn

充足区ブロッコリーにおいては新葉より古葉で高く、Mn 欠乏区ブロッコリーでは古葉より新葉で高くなり、一定の傾向は見られなかった。また、ダイズの Cu 濃度は、いずれの区でも有意差はなかった。Zn 濃度は、ブロッコリーでは古葉より新葉で高い結果であったが、ダイズでは傾向はわからなかった。Zn の移行については、植物種により異なる可能性があると思われた。K 濃度は、ブロッコリーとダイズの両方で古葉より新葉で高かった。このことは、K は代謝がさかんな組織に集まるとの知見¹⁵⁾と一致する結果であった。P 濃度は、ブロッコリーでは古葉より新葉で高く、P は代謝がさかんな組織で P 化合物として機能していると思われたが、ダイズはブロッコリーとは反対に、新葉より古葉で高い濃度となった。S 濃度は、ブロッコリーとダイズほぼ同じ傾向を示した。P、S は、Cl と同様に植物体内を主に陰イオンの形態で移動する^{10, 11)}が、Cl のみがダイズの新葉で検出されなかった。このことは、ダイズ新葉で Cl が検出されない現象が陰イオン共通の現象ではなく、Cl 特有の現象であることを示唆しており興味深い。

本研究で行った大気 PIXE 法を用いた元素分析においては、図 6 の Mn 欠乏区ダイズ古葉の Fe 濃度をはじめとして、測定された濃度の誤差範囲が大きい結果が複数得られた。この結果は、大気 PIXE 法で用いられるプロトンビームの照射位置が植物ごとに異なったためと考えられる。例えば、植物葉において Mn が葉縁、末梢葉脈間部、葉の先端部に蓄積される傾向が岩手大農学部の卒業研究で報告されている。Mn 以外の元素においても同様の現象が生じる可能性があり、従って、大気 PIXE 法を用いて植物葉の元素分析を行う際は、測定部位を統一する必要があると思われた。

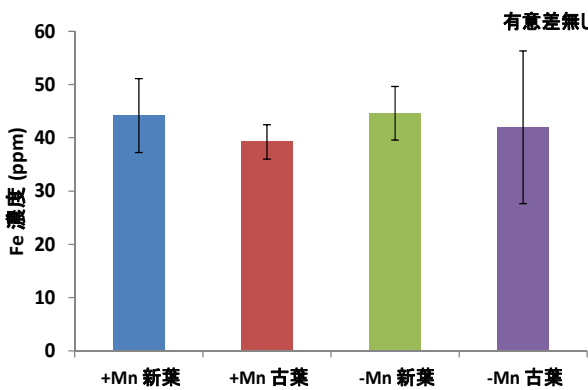


図 5 ブロッコリーの葉の Fe 濃度

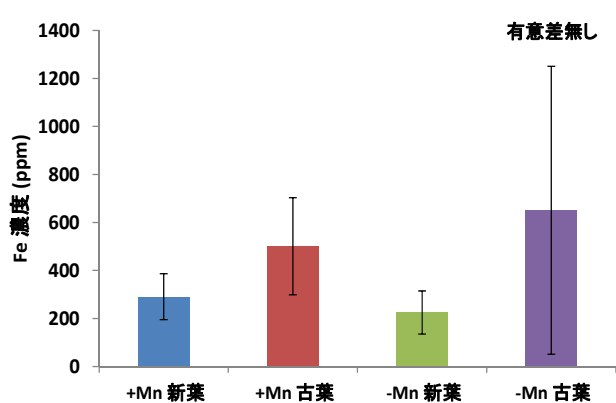


図 6 ダイズの葉の Fe 濃度

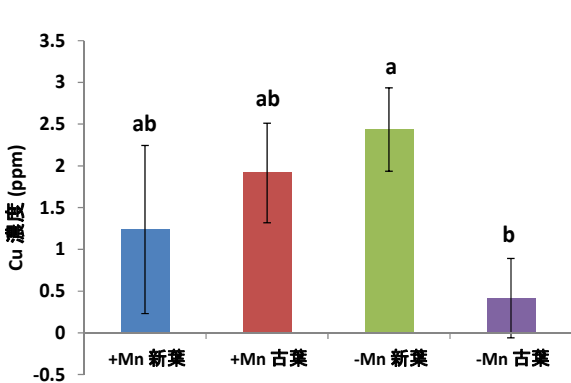


図 7 ブロッコリーの葉の Cu 濃度

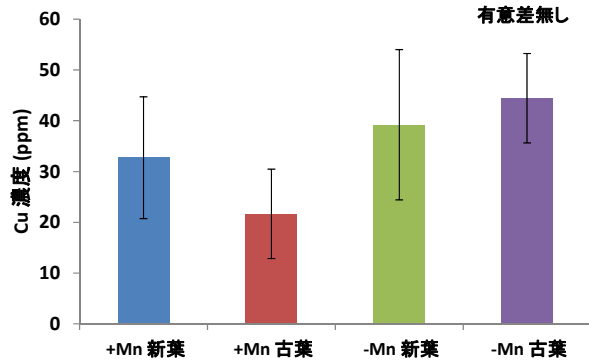


図 8 ダイズの葉の Cu 濃度

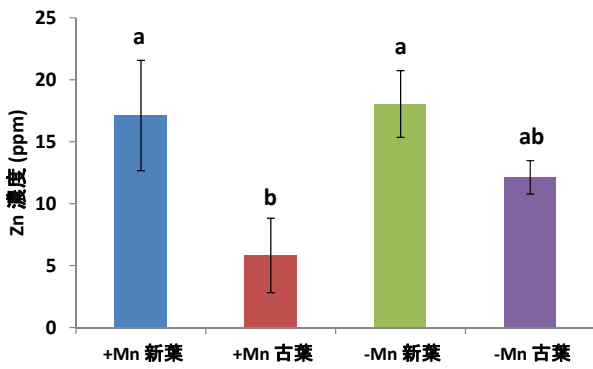


図9 ブロッコリーの葉の Zn 濃度

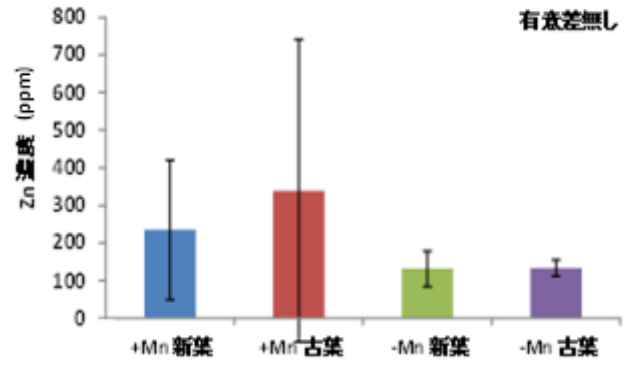


図10 ダイズの葉の Zn 濃度

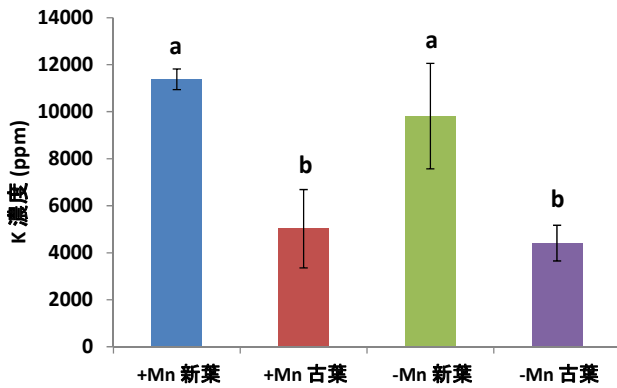


図11 ブロッコリーの葉の K 濃度

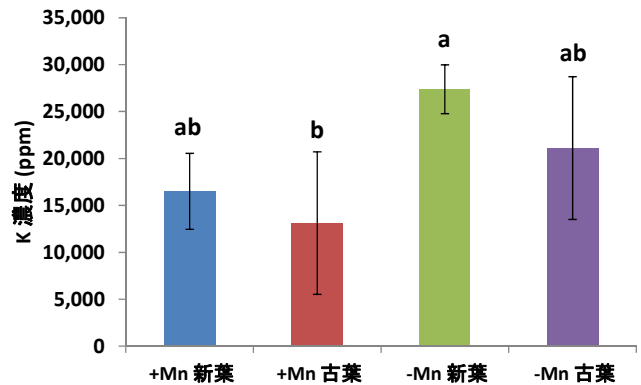


図12 ダイズの葉の K 濃度

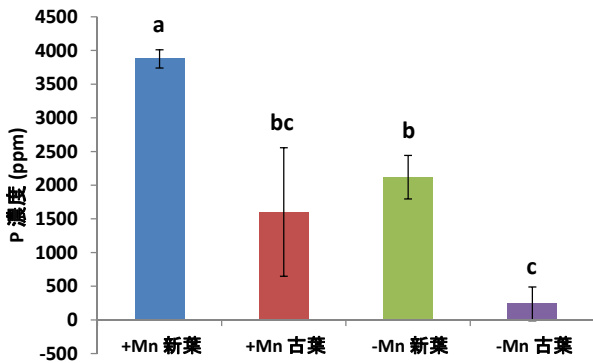


図13 ブロッコリーの葉の P 濃度

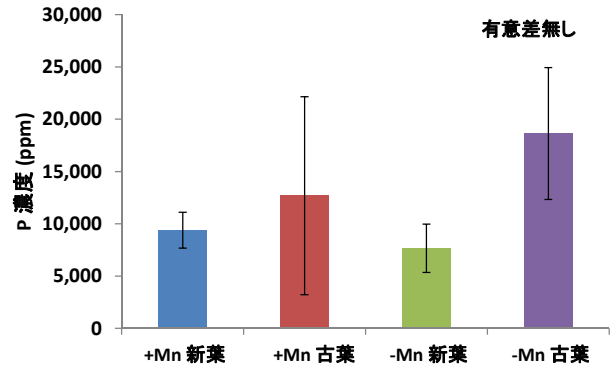


図14 ダイズの葉の P 濃度

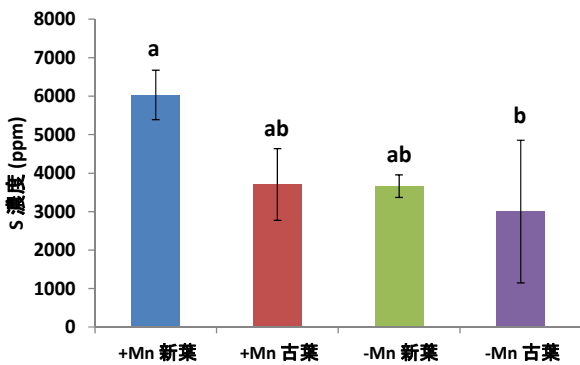


図15 ブロッコリーの葉の S 濃度

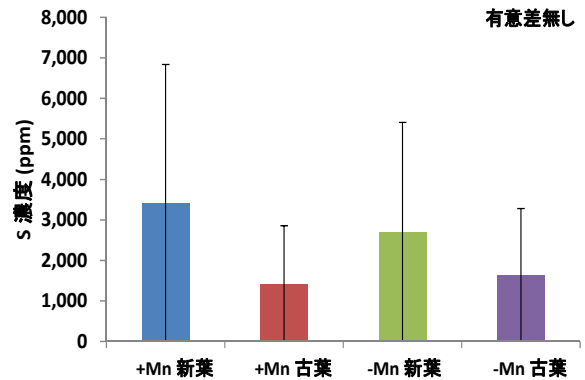
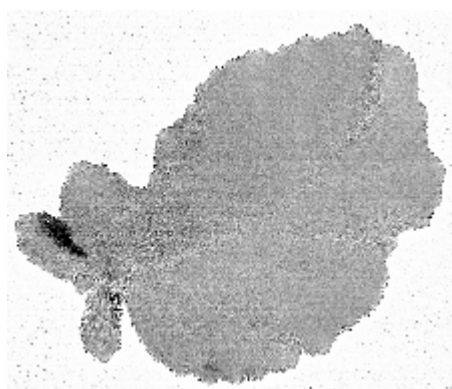


図16 ダイズの葉の S 濃度

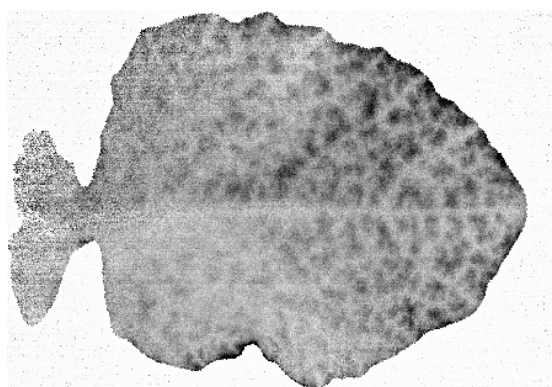
蛍光分析による光合成活性測定



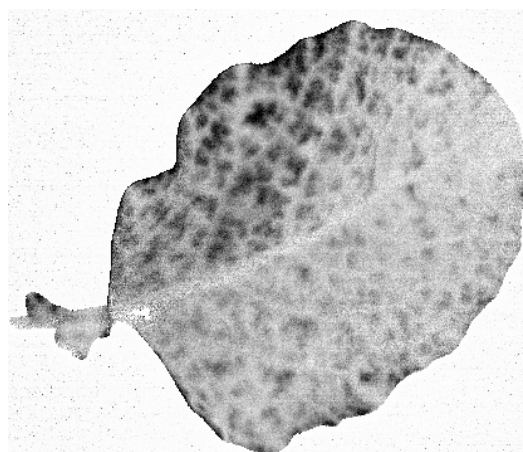
- Mn 植物 第 6 葉



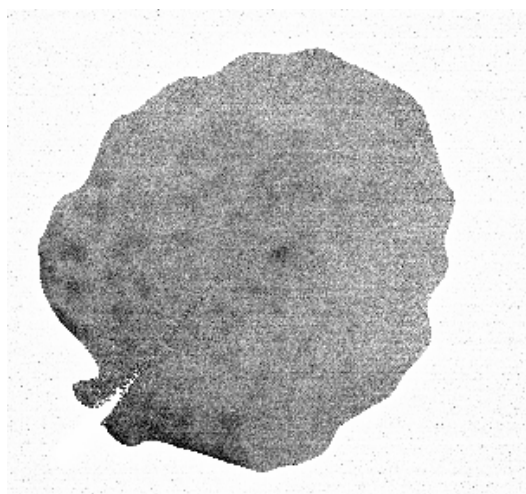
- Mn 植物 第 5 葉



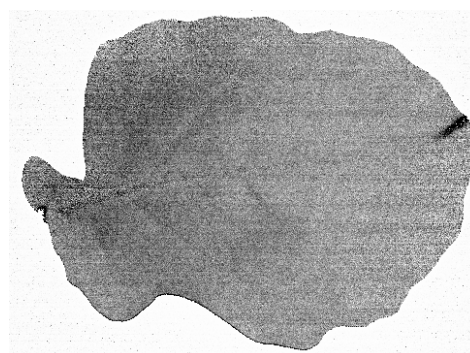
- Mn 植物 第 4 葉



- Mn 植物 第 3 葉

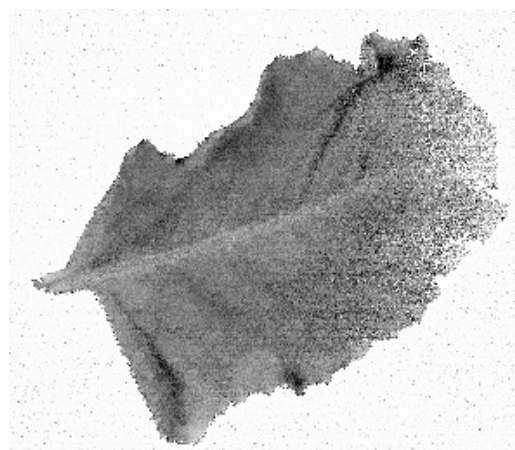


- Mn 植物 第 2 葉

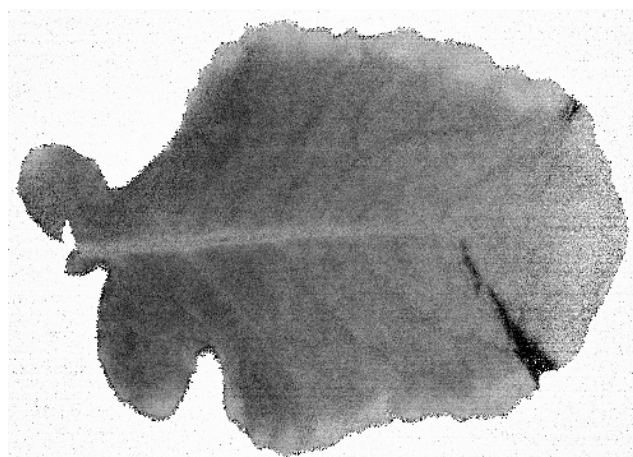


- Mn 植物 第 1 葉

図 1 7 Mn 欠乏植物の Fv/Fm のイメージ (色が薄いほうが活性が高い)



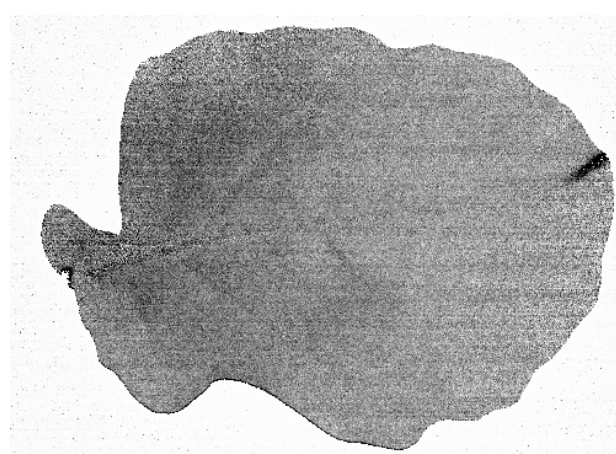
+Mn 植物 第6葉



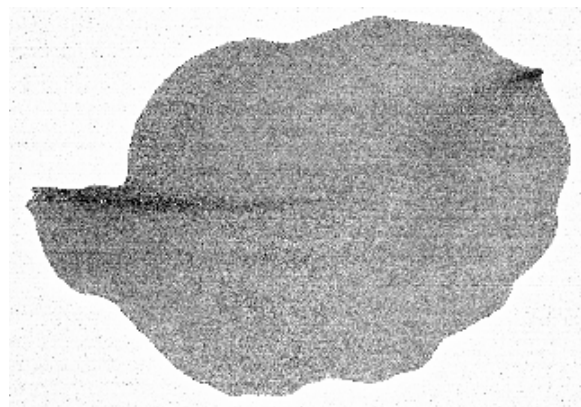
+Mn 植物 第5葉



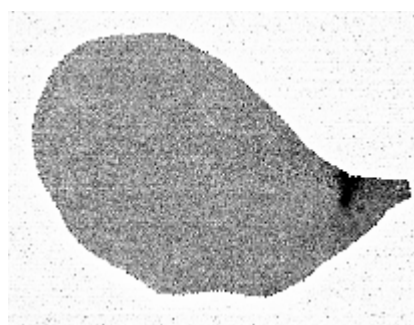
+Mn 植物 第4葉



+Mn 植物 第3葉



+Mn 植物 第2葉



+Mn 植物 第1葉

図18 Mn 欠乏植物の F_v/F_m のイメージ (色が薄いほうが活性が高い)

表1 葉の Fv/Fm 値の平均値

	Mn+	Mn-
第7葉	0.78	0.79
第6葉	0.68	0.81
第5葉	0.76	0.79
第4葉	0.8	0.78
第3葉	0.84	0.77
第2葉	0.83	0.83
第1葉	0.83	0.82

図17と18にブロッコリーの葉の光合成活性を示す Fv/Fm 値をイメージ化した図を示した。暗く見える領域は光化学系IIを流れる電子が少ないことを示しており、その領域で光合成活性が低いことを示している。図17にみられるように Mn 欠乏処理した植物は、特に第3、4葉において葉脈間で光合成活性が低い領域が明瞭にみられる。このことは、Mn 欠乏が良く展開した葉の葉脈間の細胞で明瞭に起こっていることを示している。一方、図18に示した Mn 供給植物においては葉脈間に光合成活性の低い領域は見られなかった。

表1には Mn 供給区と欠乏区の植物の新葉から古葉までの Fv/Fm 値を示した。この値の大小が光化学系IIの電子の流れの大きさを示している。新葉から古葉まで、光合成活性に特に大きな違いは見られなかった。

光合成の光化学系IIは葉緑体のチラコイド膜に付随する酵素が水を分解することにより、水から電子を奪いことより始まるが、Mnはその酵素の構成成分である⁶⁾。また、Clはその酵素に必要な元素であるといわれてきた^{6), 9)}。大気PIXEの結果、新葉においてMn(図1、2)とCl(図3、4)の含量が低いことが示されたが、この光合成活性との関連性は見られなかった。また、新葉においてCl含量が大変低くなる現象と光合成活性が特に低下していない現象は、注目すべきである。葉緑体での酸素発生のために必要なインタクトな葉緑体のClの要求量は、葉緑体に局在化していなければ1mM以下であると論じられているが、光合成におけるClの必須性については、議論があるようである⁶⁾。Clの光合成における機能については、今後、研究し、定説を検討していく必要があると思われた。

謝辞

蛍光分析による光合成活性測定を行うにあたり、岩手大学寒冷バイオ研究センターの河村幸男准教授のご指導をいただきました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 石井聡(2002) マイクロビームを用いた大気照射PIXEへの取り組み (<http://www.tech.tsukuba.ac.jp/2002/abstract/21ishii.pdf>)
- 2) Sera K., Futatsugawa S., Matsuda K., Miura Y. (1996) Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples. *Int'l. J. PIXE* 6 (3) (4): 467-481.
- 3) 世良耕一郎・寺崎一典・佐々木敏秋・後藤祥子・齋藤義弘・伊藤じゅん・二ッ川章二 (2007) 大気PIXEにおける物理的定量法の開発, NMCC 共同利用研究成果報文集, 14, 213-221. (http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2006_2007_j1.2.21.pdf)
- 4) 世良耕一郎・寺崎一典・佐々木敏秋・後藤祥子・齋藤義弘・伊藤じゅん (2007) 大気PIXEにおける無標準法の開発, NMCC 共同利用研究成果報文集, 14, 222-230. (http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2006_2007_j1.2.22.pdf)
- 5) 世良耕一郎・後藤祥子・高橋千衣子・齋藤義弘 (2010) 大気PIXEによる生きた植物試料に対する無標準定量分析法の開発, NMCC 共同利用研究成果報文集, 17, 69-80. (http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2010_1.2.03.pdf)
- 6) Marschner, H. (1995) Functions of Mineral Nutrients: Micronutrients. Manganese. In *Mineral Nutrition of Higher Plants* (ed. H. Marschner), p.324-333.

- 7) Hewitt, E.J. Smith, T.A. (1975) Experimental methods for the investigation of plant nutrients., Plant Mineral Nutrition (E.J. Hewitt and T.A. Smith eds), The English Universities Press Ltd., London, 30-52.
- 8) 清水碩 (2007) 植物生理学 (改訂版) 裳華房 p. 45.
- 9) 清水碩 (2007) 植物生理学 (改訂版) 裳華房 p. 47.
- 10) 間藤 徹 (2010) 新植物栄養・肥料学 米山忠克ら朝倉書店 p. 99~100.
- 11) 間藤 徹 (2010) 新植物栄養・肥料学 米山忠克ら 朝倉書店 p. 105~106.
- 12) Jones J. B. Jr. (1970) Distribution of fifteen elements in corn leaves. Soil Science Plant Analysis, 1, 27~33.
- 13) Schreiber, U., Walz, H., Kolbowski, J. (2003) Propagation of spatial variations of chlorophyll fluorescence parameters in dandelion leaves induced by laser spot heating. PAM News, 1, 1-18.
- 14) Ehlert, B., Hinch, D.K. (2008) Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in Arabidopsis leaves. Plant Methods, 4, 12.
- 15) 清水碩 (2007)植物生理学 (改訂版) 裳華房 p. 42~43.
- 16) Hans-Walter Heldt (1999) Pflanzensystematik 植物生理学 金井龍二訳 シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社 p. 72-74.

**Difference of concentration of elements
depending on age of the leaves of plants
—Measurement of elements in plants by in-air PIXE—**

S. Kawai¹, S. Moizumi¹, S. Goto² and K. Sera³

¹Faculty of Agriculture, Iwate University
3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

²Takizawa Laboratory, Japan Radioisotope Association
348-1 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

³Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

Soybean (*Glycine max* cv. Nanbushirome) and Broccoli (*Brassica oleracea* cv. Haitzu) were hydroponically grown under Mn supplied (+Mn) or Mn depleted (-Mn) condition in the green house of Iwate University. Relationships among the effect of Mn deficiency, leave's age, concentration of elements, and activity of photosynthesis were investigated. The plant were transferred to Takizawa Laboratory, Japan Radioisotope Association and concentrations of the elements of the intact leaves of the plants were analyzed by in-air PIXE (Proton Induced X-Ray Emission). In the separate experiment, value of Fv/Fm, one of the index of activity of photosynthesis, of the leaves of Broccoli was measured by two dimensional IMAGING-PAM Chlorophyll Fluorometer (FluorCam 800MF) in Cryobiofrontier Research Center of Iwate University. Our aim was to verify the effect of Mn and age of leaves on photosynthesis in the plants.

The results showed that Mn and Cl concentrations of soybean or Broccoli were low in new leaves, especially, in Cl concentration. The result of Cl was different from those of P and S which are also translocated in the anionic forms in plants. Difference of the concentration of elements in leaves between presence and absence of Mn supply was small. Analysis by chlorophyll fluorescence imaging showed that activity of photosynthesis in the interveinal areas of the leaves of the Mn depleted plant was low, especially in 3rd and 4th leaves. The activity of photosynthesis shown by the data of Fv/Fm was not affected by the difference of Mn supply. In these experiments, the relationship between element concentrations and photosynthesis activity was not apparent.

It was noticeable that photosynthesis activity is not affected in spite of very low concentration of Cl in the new leaves. It was suggested that the relationship between photosynthesis activity and Cl concentration in plants, and that functions of Cl in photosystem II needed to be reinvestigated.