

## ニンジンの培養組織のクロロフィル蛍光動画像解析

大政 謙次

国立環境研究所

## Image Analysis of Chlorophyll Fluorescence Transients of Cultured Carrot Tissues

Kenji OMASA

*The National Institute for Environmental Studies, Tsukuba 305, Japan*

Rapid changes (CFI) in intensity of chlorophyll *a* fluorescence during dark-light transient reflect the various reactions of photosynthesis. The image analysis of CFI gives information not only about the localized differences in photosynthetic activity on whole leaves *in situ* but also on the development of photosynthetic system.

Development of the photosynthetic system in cultured tissues is very complex. Therefore, the development of carrot (*Daucus carota* L. cv US-Harumakigosun) tissues was studied by the image analysis of CFI. The nodular callus, which had been formed by culturing 1-week-old hypocotyl segments on MS agar medium containing 2,4-D (1 mg·l<sup>-1</sup>), was used for the experiments. After the nodular callus was transplanted to MS agar medium without 2,4-D, the embryogenic cells appeared within 2 to 3 weeks. The tissues grew under 25°C air temperature and 80 μmol photons·m<sup>-2</sup>·sec<sup>-1</sup>. At 3 days after the transplanting, the appearance of chlorophyll *a* in the nodular callus was detected by the CFI images. The CFI patterns changed in the development of photosynthetic apparatus of developing leaves. The changes in each developing stage were very complex but the progress in the photosynthetic system was diagnosed by the CFI curves. The CFI pattern of the developing leaves at 60 days after the transplanting were similar to the typical pattern of mature leaves.

(Received April 2, 1992)

1992年4月2日受付

## 緒 言

植物葉に光を照射するとクロロフィル *a* から蛍光が発せられる。とくに、葉を数十分程度暗所に置いたのち、光照射すると、その蛍光の強度が時間的に複雑な変化をする。この現象は、Kautsky 効果あるいはクロロフィル蛍光の誘導期現象とよばれ、光合成機能、とくに光化学系 II の電子受容体 Q<sub>A</sub> の酸化還元状態を反映し、電子伝達反応や光リン酸化反応などの各光合成過程の状態に影響されることが知られている<sup>1,2)</sup>。それゆえ、おもに、反応系が非常にデリケートで失活しやすい光化学系 II の研究に利用され、また、最近では、植物の光合成機能を非破壊で診断するための有効な情報として注目されて

いる<sup>3-6)</sup>。

いっぽう、組織培養技術を用いた苗生産の効率化のために、培養器内の環境調節や順化過程の促進の問題が注目されている<sup>7-10)</sup>。このため、培養器の環境条件と培養組織の増殖や器官分化に伴う光合成機能の変化との関係を明かにする必要があるが、従来の同化箱方式の光合成測定法では、わずかな光合成機能の変化や分化した各器官の機能の解析には限界があった。このため、筆者らが開発したクロロフィル蛍光動画像計測システム<sup>11,12)</sup>を用いて、画像情報として培養組織を解析し、培養組織の器官分化と光合成機能の変化との関係について検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

実験材料としては、2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) を添加した MS (Murashige-Skoog) 寒天培地で、ニンジン (*Daucus carota* L. cv US-Harumakigosun) の胚軸を培養して得られたカルスをを用いた<sup>13)</sup>。一週間程度で胚軸にカルスが形成され、一カ月程度で移植可能な小瘤状カルスの状態にまで増殖した。この小瘤状カルスを2,4-Dを含まないMS寒天培地に移植し、 $25^\circ\text{C}$ 、 $80 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  程度の環境条件下で培養し、実験に使用した。

### 2. クロロフィル蛍光動画像の計測

小瘤状カルスをMS寒天培地に移植した後のカルスにおけるクロロフィルの生成や分化した光合成器官の機能の発達について、クロロフィル蛍光動画像計測システム<sup>14,15)</sup>を用いて計測した。実際には、実験材料を20分程度暗条件下に置いたのち、青色光 ( $0.4 \sim 0.6 \mu\text{m}$ ) を照射し、その後、実験材料から発せられる蛍光の変化を、 $0.683 \mu\text{m}$  の干渉フィルタ (半値幅  $0.01 \mu\text{m}$ ) を通して、 $1/60$  秒ごとに、高感度で残像が少ない CCD カメラで計測した。画像記録には、タイムコード読み取り機能とタイムベースコレクタ機能をもつ VTR および光ビデオディスクレコーダを用い、再生画像を高速画像処理システムで解析した。このシステムの解像度は、CCD カメラに通常の  $50 \text{ mm}$  レンズを装着した場合で  $0.3 \text{ mm}$ 、クローズアップレンズ (たとえば、Nikon Micro-NIKKOR  $105 \text{ mm} + \text{PK13}$ ) を装着した場合で  $15 \mu\text{m}$  である。実験材料に照射した青色光の強度は、 $100 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  で、照射時刻の制御は、CCD カメラと同期したシャッターにより厳密に行った。

## 実験結果および考察

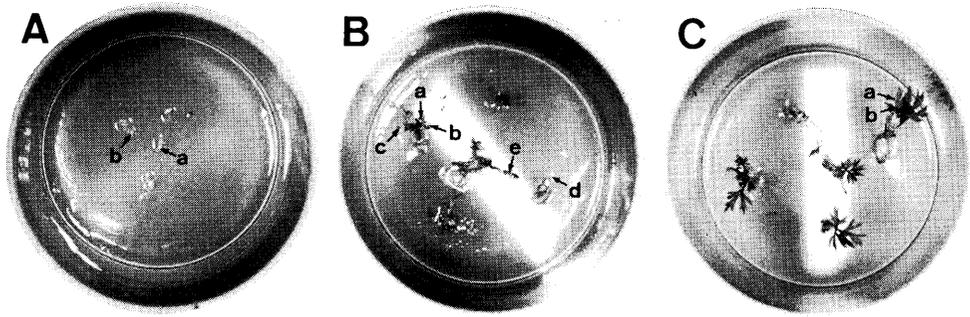
Fig. 1 は、小瘤状カルスを2,4-Dを含まないMS寒天培地に移植したのちの器官分化を示す写真である。ニンジンの胚軸の培養では、 $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  程度の2,4-D (オーキシン) の存在が、黄色がかった小瘤状カルスの形成を引き起こし、これを2,4-Dを含まないMS培地に移植すると、2~3週間で不定胚が誘導されることが知られている<sup>13)</sup>。Fig. 1A は移植3日後の黄色がかった小瘤状カルスの状態、B は1カ月後のカルスから誘導された不定胚が成長し、本葉が出始めた状態、C は2カ月後の土壌へ移植できる苗にまで成長した状態である。

Fig. 2 は、Fig. 1 の A と C の代表的な部位 (a, b) におけるクロロフィル蛍光誘導期現象の例である。また、Fig. 3 と Fig. 4 は、誘導期現象の代表的な時点 (I, P,

M, T) における蛍光動画像である。Fig. 1A のカルスは、外見状緑色でないにもかかわらず、蛍光強度の経時変化に差が認められた。これは、カルスにおけるクロロフィル *a* の形成と係わっており、クロロフィル *a* が形成されたもの (部位 a) とそうでないもの (部位 b) があることがわかる。一般に、カルスを光照射下で培養するとクロロフィル *a* が形成され、緑色の濃いカルスでは光独立栄養条件下でカルスの継代培養が可能なが知られている<sup>14)</sup>。しかし、部位 a のカルスの蛍光誘導期現象は、成熟葉でみられる典型的な OIDPSMT 過程は示さず、光独立栄養状態にはないことを示している。なお、蛍光動画像において、培養びんの輪郭がみえるのは、培養組織からの蛍光が反射しているためである。

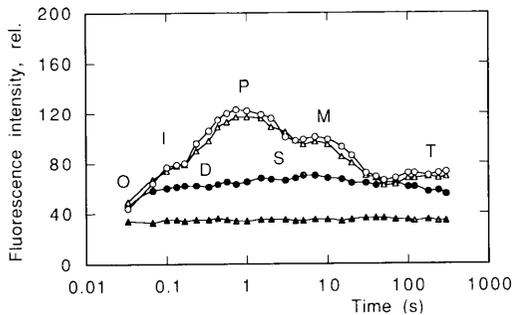
Fig. 1C は、土壌に移植可能な状態にまで育成した苗であるが、部位 a, b における蛍光誘導期現象は、完全な成熟葉でみられる典型的な OIDPSMT 過程<sup>15,16)</sup>に近い蛍光強度の経時変化を示しており、光独立栄養成長の状態に移行していることがわかる。蛍光解析の知見から、OI の過程は光化学系 II の初期電子受容体  $Q_A$  の光還元を、ID は光化学系 I による  $Q_A$  の酸化を、また、DP は光化学系 II を介した水からの電子の流れによる  $Q_A$  の還元を反映しているといわれている<sup>17)</sup>。いっぽう、PS や SM, MT などは、前述の反応に加えて、光化学系 I の還元側の光活性化による  $Q_A$  の再酸化や高リン酸化反応に関係するチラコイド膜を介した高エネルギー状態、炭酸固定反応など種々の反応過程の影響を受けることが知られている<sup>18,19)</sup>。葉の蛍光誘導期現象は、その成長に伴って、P の長時間側への移行 (2 sec 程度) と DP 変化の増大、および S と M の肩の増大などが知られている<sup>15,16)</sup>。Fig. 1C の部位 a, b における蛍光誘導期現象は、幼葉時の典型的な蛍光誘導期現象とみることができる。いずれにしても、幼葉における光合成器官の発達は不十分で、光独立栄養の状態にあるといっても、DP 変化や、S, M の肩が小さく、二酸化炭素の吸収でみた光合成速度も小さい。

Fig. 5 は、Fig. 1B の代表的な部位 (a~e) におけるクロロフィル蛍光誘導期現象の例である。また、Fig. 6 は、Fig. 3, 4 の (I, P, M, T) と同じ時点における蛍光動画像である。Fig. 1B の写真をみると、程度の差はあるが葉の展開が不十分で、葉色にもばらつきがみられる。蛍光強度の経時変化のパターンは各部位でまったく異なっており、育成のよい一部の葉で Fig. 1C の部位 a, b でみられた幼葉時の蛍光誘導期現象に近いパターンを示すものもあったが、がいて光合成器官の発達が不十分で、典型的な蛍光誘導期現象は示さなかった。具体的



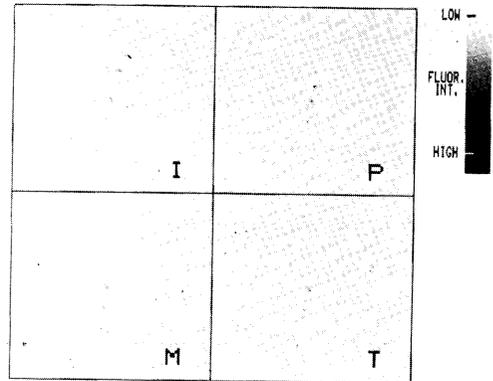
**Fig. 1** Photographs of cultured carrot tissues after transplant to MS agar medium without 2,4-D from that containing 2,4-D ( $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

A, Nodular calluses at 3 days after the transplant; B, Tissues after 30 days; C, After 60 days. The tissues were cultured under  $25^\circ\text{C}$  air temperature and  $80 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  light intensity. The sites shown by symbols (a to e) correspond to those in Figs. 2 and 5.

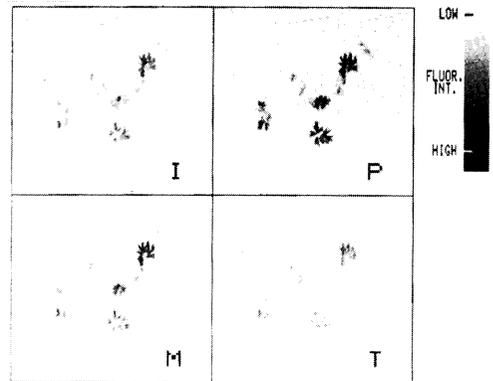


**Fig. 2** Chlorophyll fluorescence induction (CFI) curves at sites shown in Fig. 1 A and C.

After dark adaptation for 20 min, CFI images were measured under  $100 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  actinic light and  $25^\circ\text{C}$  air temperature. The CFI curves at different sites ( $\bullet$ , Site a in Fig. 1 A;  $\blacktriangle$ , Site b in A;  $\square$ , Site a in C;  $\triangle$ , Site b in C) were calculated from a series of CFI images.



**Fig. 3** CFI intensity images of nodular calluses shown in Fig. 1A at characteristic transient levels (I—0.1 sec, P—1 sec, M—10 sec, T—300 sec).



**Fig. 4** CFI intensity images of tissues shown in Fig. 1C at characteristic transient levels. The time points of characteristic transient levels are similar to those of Fig. 3.

に、もっともよく成育している個体の部位 a~c の蛍光強度の変化についてみると、部位 a は、比較的幼葉の蛍光誘導期現象のパターンに近かったが、OI や II が観察されず、また、S や M の肩も認められなかった。いっぽう、部位 b は、OP の立ち上がりが高く、また、最高強度およびその持続時間ともに大きかったが、部位 c では、DP の立ち上がりすら観察されなかった。このことは、ひとつの個体でも光合成器官の発達段階が異なることを示している。その原因としては、部位による器官分化の時期の違いに加えて、成育段階で受ける過度のストレスの影響の違いが考えられる。

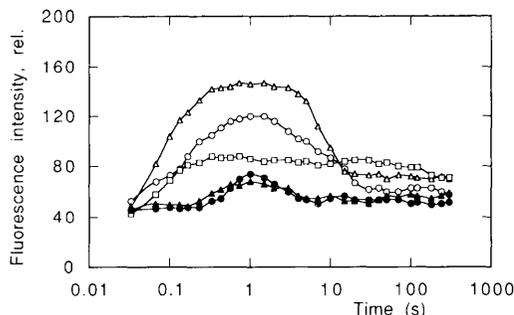


Fig. 5 CFI curves at sites shown in Fig. 1B.

The CFI curves at different sites (○, Site a; △, Site b; □, Site c; ●, Site d; ▲, Site e) were calculated from a series of CFI images.

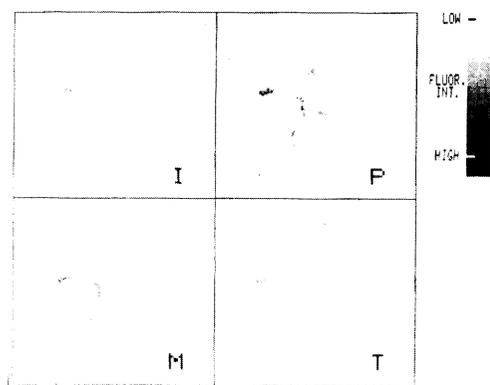


Fig. 6 CFI intensity images of tissues shown in Fig. 1B at characteristic transient levels.

The time points of characteristic transient levels are similar to those of Fig. 3.

通常、クロロフィル蛍光誘導期現象の解析には、葉面からの蛍光を光電子倍增管やフォトダイオードによりスポットで計測し、解析する方法がよく用いられ、いくつかのタイプの異なる可搬型の装置も市販されている。しかし、これらの装置では、葉面の部位による光合成機能の違いやわずかな機能変化を正確にとらえることは困難であり、先に述べた現象を区別して解析することはできない。また、平均値的な変化に関する情報を提供するので、実際の状態とは異なった診断をくだしてしまうことが多々生じる。ここで述べたクロロフィル蛍光動画像計測システムを用いれば、0.3 mm (クローズアップレンズとの併用により 15 μm) の解像度で蛍光誘導期現象の解析ができ、培養組織のようなミクロなレベルでの光合成機能の診断にも有効的に利用できる。実際、ニンジンの

組織培養において、カルスにおけるクロロフィルの形成や葉の成育段階における光合成器官の発達段階が診断できることがわかった。また、この手法により、培養組織の従属栄養状態、混合栄養状態、光独立栄養状態などの診断も可能であることが示唆された。

本研究を進めるにあたり、ご助言、ご協力をいただいた当研究所の佐治 光主任研究員、青野光子研究員と筑波大学の植物発生生理の研究室の方々に謝意を表す。

## 文 献

- PAPAGEORGIOU, G. 1975. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In "Bioenergetics of Photosynthesis" (Ed. by Govindjee) 319-371, Academic Press, New York.
- LICHTENTHALER, H. K. (Ed.). 1988. "Applications of Chlorophyll Fluorescence" 1-366, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 大政謙次・近藤矩朗・井上頼直(編). 1988. 「植物の計測と診断」73-81, 166-168, 朝倉書店, 東京.
- OMASA, K. 1990. Image instrumentation methods of plant analysis. In "Modern Methods of Plant Analysis. New Series, Vol. 11" (Ed. by Linskens, H. F. and J. F. Jackson) 203-243, Springer-Verlag, Berlin.
- SMILLIE, R. M. and S. E. HETHERINGTON. 1990. Screening for stress tolerance by chlorophyll fluorescence. In "Measurement Techniques in Plant Science" (Ed. by Hashimoto, Y., P. J. Kramer, H. Nonami, and B. R. Strain) 229-261, Academic Press, San Diego.
- OMASA, K. and K. SHIMAZAKI. 1990. Image analysis of chlorophyll fluorescence in leaves. In "Measurement Techniques in Plant Science" (Ed. by Hashimoto, Y., P. J. Kramer, H. Nonami, and B. R. Strain) 387-401, Academic Press, San Diego.
- 本條 毅・高倉 直. 1987. 植物組織培養によるシンビジウム PLB 増殖への CO<sub>2</sub> 濃度、光強度および液体培地組成の影響. 農業気象 43: 223-227.
- 土井元章・小田 尚・浅平 端. 1989. C<sub>3</sub> および CAM 植物の培養器内気相環境と日長の関係. 生物環境調節 27: 9-13.
- 谷 晃・清田 信・平 知明・相賀 一郎. 1991. 光独立栄養条件および光混合栄養条件下で培養されたアルファルファ小植物体の生長および光合成速度. 生物環境調節 29: 127-132.
- 古在豊樹・久保田智恵利. 1992. 植物組織培養苗生産における環境調節. 遺伝 46(4): 32-36.
- OMASA, K., K. SHIMAZAKI, I. AIGA, W. LARCHER, and M. ONOE. 1987. Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. Plant Physiol. 84: 748-752.
- OMASA, K., S. MARUYAMA, M. A. MATTHEWS, and J. S. BOYER. 1991. Image diagnosis of photosynthesis in water-deficit plants. In "Mathematical and Control Applications in Agriculture and Horticulture" (Ed. by Hashimoto, Y. and W. Day) 383-388, Pergamon Press, Oxford.

- 13) 鎌田 博・原田 宏. 1979. 不定胚分化. 「植物細胞組織培養」(原田 宏・駒嶺 稔編) 91-104, 理工学社, 東京.
- 14) 庄野邦彦. 1979. カルスの培養(増殖, 分化). 「新植物組織培養」(竹内正幸・中島哲夫・古谷 力編) 54-80, 朝倉書店, 東京.
- 15) CROXDALE, J. G. and K. OMASA. 1990. Chlorophyll *a* fluorescence and carbon assimilation in developing leaves of light-grown cucumber. *Plant Physiol.* **93**: 1078-1082.
- 16) CROXDALE, J. G. and K. OMASA. 1990. Patterns of chlorophyll fluorescence kinetics in relation to growth and expansion in cucumber leaves. *Plant Physiol.* **93**: 1083-1088.
- 17) BRADBURY, M. and N. R. BAKER. 1981. Analysis of the slow phases of the *in vivo* chlorophyll fluorescence induction curve. Changes in the redox state of photosystem II electron acceptors and fluorescence emission from photosystems I and II. *Biochim. Biophys. Acta* **635**: 542-551.
- 18) KRAUSE, G. H., J.-M. BRISNTAIS, and C. VERNOTTE. 1981. Two mechanisms of reversible fluorescence quenching in chloroplasts. In "Photosynthesis. I. Photophysical Processes—Membrane Energization" (Ed. by Akoyunoglou, G.) 575-593, Balaban International Science Services, Philadelphia.
- 19) WALKER, D. A. 1981. Secondary fluorescence kinetics of spinach leaves in relation to the onset of photosynthetic carbon assimilation. *Planta* **153**: 273-278.