

キャベツの耐凍性獲得および消失に関する研究[†]

佐々木 英 和*

(平成 14 年 12 月 27 日受理)

Studies on Acquisition and Loss of Freezing Tolerance in Cabbage

Hidekazu SASAKI

Synopsis

Acquisition and loss of freezing tolerance in cabbage (*Brassica oleracea* L.) were investigated. Cabbage seedlings acquired freezing tolerance during exposure to non-freezing low temperature (cold acclimation) and the acquired freezing tolerance was lost by returning the plants to moderate temperature (deacclimation). The period required for deacclimation was much shorter than that for cold acclimation in cabbage. The short-term deacclimation was shown in the cabbage grown in the field during winter and the deacclimation by the rise of head leaf temperature could be transiently controlled by shading. Soluble sugars, except *myo*-inositol, accumulated during cold acclimation in the leaves of cabbage seedlings. During deacclimation, sucrose, glucose and fructose contents decreased rapidly to the same levels as before cold acclimation. Activities of sucrose synthase (SS) and sucrose phosphate synthase (SPS), were sucrose metabolizing enzymes in cabbage, increased during cold acclimation, but decreased to the levels of activity before cold acclimation during deacclimation. These results suggest that SS and SPS, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation and sugar accumulation would play important roles in acquisition of freezing tolerance in cabbage.

Key Words : *Brassica oleracea* L., cold acclimation, deacclimation, freezing tolerance, sucrose synthase, sucrose phosphate synthase, sugar

	5 要 約	220
	II 低温順化と脱順化の解析	220
	1 緒 言	220
	2 材料および方法	220
	3 結 果	221
	4 考 察	223
	5 要 約	224
	III 冬季栽培のキャベツ結球葉における脱順化の解析	225
	1 緒 言	225
略語表	214	
緒 言	214	
I 耐凍性機構に及ぼす環境要因の影響	217	
1 緒 言	217	
2 材料および方法	217	
3 結 果	218	
4 考 察	219	

〒514-2392 三重県安芸郡安濃町草生 360
生理生態部

* 現 独立行政法人 農業技術研究機構 東北農業研究センター 野菜花き部

† 本論文は名古屋大学大学院学位審査論文を基に編集・加筆したものである。本報告の一部は, *Annals of Botany*, Vol. 78: 365-369 (1996); *Sci. Hort.*, Vol. 76: 161-169 (1998); *JARQ*, Vol. 34: 261-264 (2000); *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, Vol. 70: 294-298 (2001); *J. Plant Physiol.*, Vol. 158: 847-852 (2001); *園芸学研究* Vol. 1: 49-51 (2002); *園芸学研究* Vol. 1: 133-136 (2002) において発表した。

2 材料および方法	225
3 結果	226
4 考察	227
5 要約	228
IV 糖蓄積と耐凍性機構の関係	228
1 緒言	228
2 材料および方法	229
3 結果	230
4 考察	232
5 要約	233
V 低温順化・脱順化時におけるスクロース代謝の解析	234
1 緒言	234
2 材料および方法	234
3 結果	235
4 考察	238
5 要約	239
総合摘要	239
引用文献	240
Summary	243

略語表

ADP : adenosine diphosphate
DMSO : dimethylsulfoxide
DW : dry weight
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
FW : fresh weight
HEPES : N-2-hydroxyethylpiperazine- N'-ethanesulfonic acid
HPLC : high performance liquid chromatography
LT ₅₀ : lethal temperature for 50% of the material
MES : 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
mRNA : messenger ribonucleic acid
Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane
UDP : uridine diphosphate

緒言

1) キャベツの作型

キャベツは、元来冷涼な気候を好み、高温期には結球不良で病気の発生が多く、また低温期には生育が停滞す

る(芦澤, 1985)。一般的な中生種を適温で栽培すると、播種から収穫まで110~140日を要する。一般的な移植栽培では播種後3~4週間で定植され、定植後40~50日で結球開始期となり、40~60日で結球完了し、品種によっては玉割れを生ずる。グリーンプラントバーナリゼーション植物であるため、一定の大きさに達したキャベツが一定期間以上低温に遭遇すると感応して花芽分化し、その後、気温が上昇してくると抽だいする(芦澤, 1973)。花芽分化すると生殖成長に切り替わり、葉数が増加しないために結球せずに不時抽だいを引き起こしたり、球内で花茎が伸長して品質を落とすことになる。したがって、栽培する季節によって低温感応性や抽だい特性を考慮した品種が選択されている。図-1は晩秋に定植したキャベツの苗であるが、春の雪解けとともに抽だいいし、結球することなく苗のまま開花に至った。

芦澤(1985)は「欧米では春まき越夏栽培が主体であるが、日本では夏の高温が厳しいために北海道や東北地方を除き秋まき栽培が主流をなしてきた。戦後、食生活の変化に伴ってキャベツに対する需要が増加し、周年供給の要求が高まった。特に小笠原・沖縄からの移入の断絶により端境期となった冬~春どり品種の育成が要望された。これに応じて冬どり用品種が育成され、夏まき冬~春どり栽培の可能性が開けた。」と変遷について述べている。

現在の日本における作型は、大きく以下の3つに分けられる。

春まき栽培：3~6月に播種して6~11月に収穫する作型で北海道・東北地方などの冷涼地帯が中心となる。



Fig. 1 Early bolting cabbage.

栽培地域が南下するにつれて夏季の高温に妨げられて栽培が困難となるため、高冷地においてこの作型が普及している。早晩生品種を作り分けることで6～11月にかけて収穫することが可能となる。

夏まき栽培：7～8月に播種し、11～4月に収穫する作型で、低温期に向かった栽培であるため暖地ほど栽培が安定しており、北上するほど栽培が困難となる。早晩生について多数の品種が分化していて、連続的に収穫できる。一般に早生品種は生育が早いですが結球時の耐寒性が弱く、中生品種は耐寒性は強いが気温が上がると抽だい・裂球しやすい。晩生品種は生育は遅いが、低温結球性が強く、抽だいが遅く裂球しにくい。

秋まき栽培：9～11月に播種し、4～7月に収穫する。水田裏作が主体で栽培面積・生産量ともに多い。日本独特の秋まき極早生群（中野早生群）の育成により成り立った作型である。栽培が比較的容易で収量も多いが、生育初期が低温期にあたるため、花芽分化・不時抽だいの危険がある。

2) キャベツ生産の現状

野菜の生産は戦後に急激な伸びをみせたが、その後は減少する品目もでてきて、いわゆる重量野菜においてその傾向が顕著であった。しかし、外食産業の成長とも関連して周年需要のあったキャベツは依然として重要な野菜のひとつであり、出荷量は野菜類の中で2位（平成10年産野菜生産出荷統計）となっている。このような生産を支えているのは、先に述べたような気象環境にあわせた作型と品種育成により周年生産が可能となっていることが要因のひとつであるが、その生産は年間を通じて安定しているわけではない。冬期間も栽培されるために降霜や凍結に遭遇することがあり、場合によっては霜や凍結の発生がキャベツに直接的に傷害を与え（図-2）、あるいは病害発生のきっかけとなって生産に被害を及ぼしている（五十嵐ら、1985）。図-3は被害を受けた葉を除去して収穫されたものである。キャベツ栽培では秋冬期間の気象変動の影響などによって、その時期のキャベツの価格が暴騰するほどの被害を受けることがある。こうした一時的な国内での供給不足は、海外からの野菜輸入によって対応される傾向もあらわれ始め、そのことにより国内のキャベツの生産を危うくする恐れも生じてきている。

また、これまで夏まき冬どり栽培には耐寒性の強い夏まき中生系や抽だいの遅い夏まき晩生系の品種が用いられ、「寒玉」と呼ばれてきた。これらの品種は球がよく



Fig. 2 Cabbage injured by freezing.



Fig. 3 Cropping of cabbages removed the leaves injured by freezing.

締まり、自己軟白性（球の内部に緑が残らず純白になる）が高く、葉質が硬くて水分は少ない性質を持つ。これに対して、芦澤（1995）によると、近年は高品質志向のひとつとして、生食に向くような特性、すなわち葉が柔軟・多汁で球の中まで黄緑色を帯びてみずみずしいことが市場から求められるようになり、こうした要求を満たす秋まき極早生群の品種の作期が前進し、夏まきで冬から早春どりされて「春玉」の名でもてはやされたが、本来の冬どり用品種に比べて結球時の耐寒性が劣る品種を最も寒い時期に栽培するために、寒冬の年には被害が大きいとされる。

以上のように、主要な野菜のひとつであるキャベツは、

比較的寒さに強い作物ではあるものの、市場価値が高いとされる春系品種の作型前進や異常気象・天候不順などにより、冬場を中心として安定生産が課題となっている。

3) 野菜の低温に対する反応と耐凍性

農作物には、果樹や麦類をはじめ越冬性植物として低温に耐えるものがある。生育ステージによって変化する場合もあるが、氷点よりも高い低温領域（冷温, non-freezing low temperature あるいは, chilling temperature）で生育できるものとできないものがあり、前者は冷温耐性植物でトマト、レタス、後者は冷温感受性植物としてキュウリなどが含まれる。さらにハウレンソウやキャベツのように氷点下の低温に対しても耐えられる植物がある（KOHNら, 1965; COXら, 1969）。秋から春にかけて、朝に緑色のままハウレンソウやキャベツの生葉が凍結しているのを見かけることがあるが、その凍結の程度（温度や時間）が植物の持つ耐凍性の程度を上回っていなければ融解後に植物は元の姿に戻るが、凍結の程度によっては、被害を受けてしまう。

キャベツの低温期の栽培において耐寒性は重要であり、植物体に凍霜害が及ぶような場合には、耐寒性の中でも特に凍結に対する耐性が問題となる。植物の凍結下でも生存できる性質は耐凍性と呼ばれており、キャベツを含む越冬性植物にはこうした耐凍性を持つものが多くみられる。また、氷点下の温度環境下で生存するために、過冷却などで凍結を回避して生存するメカニズムを持つ植物もある。例えばアジアや北アメリカの温帯地方に生息している木本性植物には、冬期には約 -40°C 近くまで生存することができるようになるものもある。これは木部が凍結に対して抵抗性を示すようになるため、深温過冷却と呼ばれている（GEORGEら, 1982）。このような凍結回避も耐寒性のひとつではあるが、耐凍性とは異なるものと分類される（酒井, 1982）。

植物の持つ耐寒性や耐凍性は種によって異なるが、それぞれの植物が持っている耐凍性の程度は、季節によって変動している（JUNGら, 1961）。一般には、秋から冬にかけて耐凍性が増加し、冬から春にかけて気温の高まりとともに耐凍性は減少し、植物は盛んな生長をみせる。このような秋から冬にかけての耐凍性増大を引き起こす一連の変化は総称して cold acclimation（低温順化）と呼ばれ、逆に、冬から春にかけての耐凍性減少の過程は deacclimation（脱順化）と呼ばれている（酒井, 1982）。

一般に野菜の耐凍性は他の植物に比べてあまり高くないため、ハウレンソウが分子生物学レベルの研究に使わ

れることもあったが（GUYら, 1987; NEVENら, 1992）、農業気象学的な試験研究を除いて耐凍性についての体系的な研究は少ない。日本におけるキャベツの周年生産や他の野菜の冬期栽培技術のためにも幅広い研究がなされる必要がある。

4) 本研究の目的

本研究では野菜の低コストで安定的な生産をめざし、低温期の栽培において問題となる凍霜害の防止・軽減技術の開発に資するために、キャベツの耐凍性機構について検討した。第I章では温度と水ストレスがキャベツ幼植物の生長と耐凍性に及ぼす影響を検討した。

第II章ではキャベツの低温順化・脱順化時の耐凍性の変化について明らかにし、次いで低温順化・脱順化時の光や水ストレスが耐凍性に及ぼす影響について検討した。

第III章では幼植物を供試して得られた第I、II章の結果をもとに圃場における結球期のキャベツでの耐凍性の変化について解明し、凍害防止技術開発に資する知見を得ようとした。

植物が低温順化によって耐凍性を獲得する過程については樹木など多くの植物で調べられており、糖質をはじめ、グリシンベタイン（KISHITANIら, 1994）や特定のアミノ酸など様々な溶質の蓄積が報告されている（ALBERDIら, 1991）。木本性植物では、秋から冬にかけて蓄積されたデンプンなどの不溶性炭水化物を可溶性糖質に変換、蓄積して、これを耐凍性機構に役立てていることが指摘されている（SAKAIら, 1968）。そこで、第IV章ではキャベツにおける糖質の挙動と耐凍性との関係について様々な条件で検討し、耐凍性機構における糖質の関与を明らかにするとともに、キャベツにおける糖蓄積に関する知見を得ようとした。

植物において比較的共通して低温に反応し蓄積される可溶性糖質は、スクロースと考えられている（GUYら, 1992）。その代謝には、スクロースを不可逆的にグルコースとフルクトースに加水分解するインベルターゼ、UDP-グルコースとフルクトース-6-リン酸からスクロース-6-リン酸を生ずるスクロース-リン酸合成酵素、およびUDP-グルコースとフルクトースが結合してスクロースを生じる可逆的反応を触媒するスクロース合成酵素の3種の酵素が直接的に関わっている。第V章ではキャベツ幼植物のスクロース合成酵素、スクロース-リン酸合成酵素、およびインベルターゼの3種のスクロース代謝関連酵素の活性変化について低温順化・脱順化との関係を調べ、キャベツの耐凍性機構を解明しようとした。

本論文のとりまとめに際し、終始懇切なる御指導を賜った名古屋大学大学院生命農学研究科教授山木昭平博士に対して、心より感謝の意を表します。また、本論文をとりまとめるに当たり、有意義な御指導と御校閲の労を賜った名古屋大学大学院生命農学研究科助教授白武勝裕博士に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、農林水産省野菜・茶業試験場花き部流通技術研究室市村一雄博士（現在 農業技術研究機構花き研究所流通技術研究室長）には、終始御指導と御鞭撻をいただき、深甚なる謝意を表します。農林水産省野菜・茶業試験場ストレス耐性研究室長小田雅行博士（現在 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科助教授）、同試験場今田成雄ストレス耐性研究室長（現在 農業技術研究機構野菜茶業研究所環境ストレス研究室長）には、日々御指導と貴重な御助言を賜り、心より感謝いたします。

研究の方向について有益な示唆と激励をいただいた農林水産省野菜・茶業試験場の諸先輩の方々に心より感謝いたします。また、実験補助を快く引き受けていただいた近藤幸子氏、山川敬子氏に厚くお礼申し上げます。

I 耐凍性機構に及ぼす環境要因の影響

1 緒言

キャベツは、比較的寒さに強い野菜であるが、年間を通じて栽培されるために気温の低い時期も露地圃場であり、降霜や凍結に見舞われて葉が一時的に凍結するような気象環境下でも生育している。これは、キャベツが耐凍性機構を持っているために可能になっていると考えられる。特に夏まき栽培に用いられるキャベツ品種では耐寒性が高いものがみられる。しかし、結球時の耐寒性がそれほど高くない春系品種が、作型の前進により厳冬期間の低温下で結球期を迎えるように栽培される傾向が強まったこと、さらに、例年にない寒波や早晩霜の来襲することなどがあるため、寒害の発生することがある。また、結球期にあるキャベツでは、外葉と結球部の耐凍性に違いがあり外葉には凍害がみられなくても結球部に被害を受けて大きな問題となる場合がある。

植物の耐凍性は、本来季節によって変動するものであり（JUNGら, 1961）、一般的には、秋から冬にかけて耐凍性が獲得され気温低下とともに向上する。そして、冬から春にかけて気温の高まりとともに耐凍性が失われていくとともに、植物は盛んな生長をみせるようになる。こうした耐凍性の変動は、温度や水分、光など様々な環

境要因によって影響を受けている（BURKら, 1976；TYLERら, 1981）。温度は、凍結を引き起こす直接的要因として重要なだけでなく、植物の栽培前歴温度として、その時点で植物の持つ耐凍性に重要な影響を及ぼしている。水分についても、植物の生育環境以上にその動態が凍結に関わっており重要な要因と考えられる。そこで本章では、耐凍性機構と環境要因の関係を明らかにするために、温度と水ストレスについてキャベツ幼植物の生長と耐凍性に及ぼす影響を検討した。

2 材料および方法

a 実験 1. 低温順化处理が地上部の生長と耐凍性に及ぼす影響

夏まき栽培用のキャベツ品種‘晩抽理想’を培養土（ブリティーソイル GOLD N-140, 大塚産業）を詰めたプラスチックポットに播種し、20/15°C（昼/夜）、12時間日長のグロースチャンバー（コイトロン, 3HN-35DA 特殊型, 小糸工業）で生育させた。光源には、メタルハライドランプ（MLBOC400C-U, 三菱電機オスラム）を用い、光強度約 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ （植物体上端）とした。播種から3週間後に幼植物を5°C、12時間日長のグロースチャンバーで0（対照）、3, 7, 10, 15日間低温順化处理した後、地上部の新鮮重を測定するとともに耐凍性についての評価を行った。耐凍性については各区の低温順化期間終了時にそれぞれ10個体の幼植物をポットごと-6°Cで2時間凍結させ、その後20/15°Cのグロースチャンバーにおき、2週間後の生存率を観察することで評価した。灌水は全期間を通して適宜行った。

b 実験 2. 葉齢の違いが耐凍性に及ぼす影響

低温下での生育ステージの違いについて検討するために、低温順化处理中に進む生育ステージに合わせて、20/15°Cのまま同じ生育ステージまで進んだものと耐凍性を比較した。なお、生育ステージとして葉齢を用いた。

実験1と同様に播種3週間後、生育させた幼植物を5°C、12時間日長のグロースチャンバーに移し、低温順化处理を開始した。低温順化处理開始時にさらに3日間20/15°Cのまま生育させた幼植物と、7日間5°Cで低温順化处理したものについて耐凍性を評価した。耐凍性は電解質漏出程度を指標とした。電解質漏出程度は、植物細胞が凍結・融解によって傷害を受け細胞膜が選択透過性を失う、あるいは構造そのものが破壊されることにより細胞内の電解質が漏出してくることを傷害程度の指標とするものである。したがって、凍結・融解後の電解質漏出程度が大きいほど凍結により傷害を受けやすい、

つまり耐凍性が低いことを表す。

本報告では電解質漏出程度は、SUKUMARANら(1972)、PEARCEら(1985)で述べられた方法を改変して測定した。すなわちキャベツ幼植物の第2葉から葉片(直径10mm)を切り出し、試験管に入れて15°Cから降温速度0.25°C/minで-4°Cまで冷却した。-2°Cに到達したところで小さな氷片を加え、冷却した脱イオン水をスプレーすることで植水した後、30分間-4°Cで凍結させてから1時間室温においた。この間の昇温速度は、約0.4°C/minであった。凍結・融解時には低温恒温器(ADVANTEC PGX-325, 東洋製作所)で温度制御を行った。試験管に15mlの蒸留水を加えて一晩室温においてからECメーター(TOA CM-1K, 東亜電波工業)を用いて電気伝導度を測定し、20分間沸騰させた後、再度測定した値に対する割合から電解質漏出程度を計算した。

c 実験3. 灌水制限による水ストレスが耐凍性に及ぼす影響

実験1と同様に播種後3週間生育させた幼植物を用いた。播種後22日目から12時間日長、20/15°Cの温度条件下で3日間毎日灌水した対照区と灌水しなかった区を設け、-2, -4, -6, -8°Cで凍結処理後の電解質漏出程度を測定した。対照区の1日当たりの灌水量は1個体約40mlであった。

3 結果

a 実験1. 低温順化処理が地上部の生長と耐凍性に及ぼす影響

非凍結低温(non-freezing low temperature)である5°Cで処理したキャベツ幼植物は生長が停止することなく、地上部新鮮重は緩やかに増加を続けた(図-4)。5°C処理10日間で地上部新鮮重は2倍となり、低温順化処理前には、展開葉数が2枚で葉齢2だったものが、低温順化処理後にはほとんどの個体で第3葉が展開していた。

耐凍性について調査した結果、5°C処理を行わない区では、-6°Cの凍結に耐えることができず全個体が枯死した(図-5)。しかし、3日間5°C処理すると40%の個体が生き残った。5°C処理期間が長くなるにしたがって凍結処理後の生存率は増加する傾向を示した。5°C処理期間の短い区では、凍結処理後に生存していても図-6のように凍結傷害がみられた。

b 実験2. 葉齢の違いが耐凍性に及ぼす影響

5°Cの低温処理開始時のキャベツ幼植物は葉齢2であり、これを7, 10日間低温処理するとその間に緩やかなら生長を続けるため、葉齢は3程度まで進んだ。一方、

低温処理せず20/15°Cでさらに3日間生育させたものも葉齢が3となり、低温処理後とほぼ同程度の生育ステージとなった。5°C処理する前の対照区の第2葉は、-4°Cでの凍結試験後の電解質漏出程度が88.2%であった(表-1)。7日間5°C処理した区では、電解質漏出程度が23.2%まで減少したが、20/15°Cで同じ生育ステージとなった区では92.3%であった。

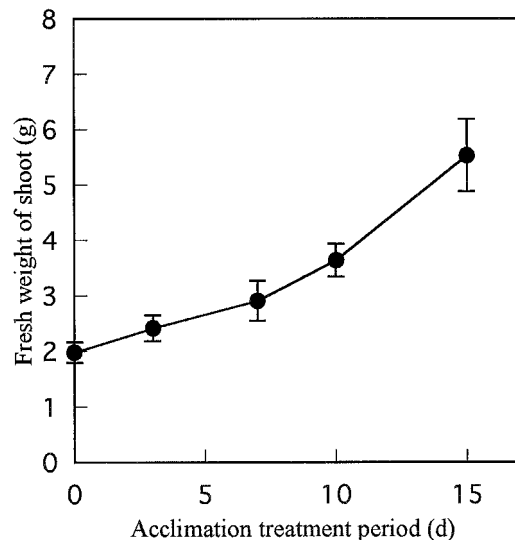


Fig. 4 Fresh weight of cabbage seedling shoot exposed to cold acclimation(5°C). Vertical bars indicate standard errors (n=6).

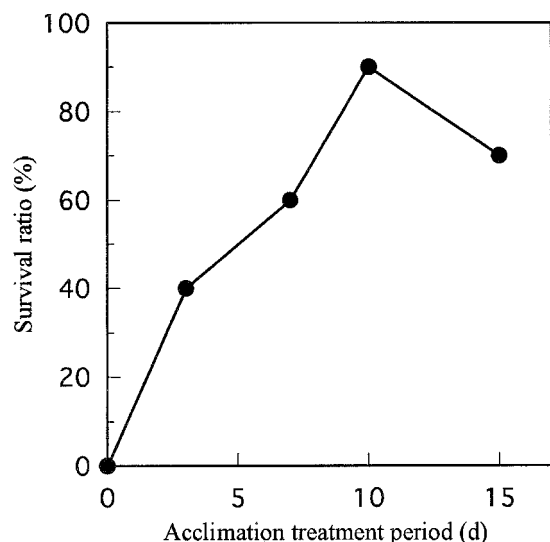


Fig. 5 Freezing tolerance of cabbage seedlings during exposure to low temperature (5°C). Freezing tolerance is expressed as survival ratio (%) determined by number of plants surviving after the freezing test (-6°C, 2h).

c 実験 3. 灌水制限による水ストレスが耐凍性に及ぼす影響

3日間灌水した対照区としなかった区の土壌含水率は、それぞれ 45.4 ± 1.6 , 22.3 ± 0.9 (平均±標準誤差) %であった。灌水を制限した区ではキャベツの葉は萎凋し、灌水の制限が植物体に水ストレスを引き起こしていることを表していた。-4°Cでの凍結試験では、水ストレスを受けた灌水制限区の電解質漏出程度が70.2%となり、対照区の86.3%よりも小さな値となった。全ての凍結試験温度で、灌水制限した区は灌水した対照区よりも小



Fig. 6 Leaf of cabbage seedling injured by freezing.

さい電解質漏出程度を示す傾向にあったが、明瞭なものではなかった(表-2)。

4 考察

KOHNら(1965)によって、キャベツが低温順化することが報告されており、5°Cの非凍結低温処理を行った本実験の結果と一致した。シロイヌナズナは、わずか12時間の低温処理で耐凍性を持つことが報告されている(GILMOURら, 1988)。5°Cの低温処理によってキャベツの耐凍性が増加したが、20/15°Cの生育適温で生育ステージが進んだだけでは耐凍性が増加することはなかったため、非凍結低温にさらされたことによる低温順化であることが明らかとなった。

細胞外凍結時には細胞は脱水されるので、植物の水ストレス耐性と耐凍性には共通するメカニズムが存在していると考えられている。実際に、水ストレスを与えることによって様々な適合溶質が増加することが報告されている(KELLERら, 1993)。乾燥ストレスは、冬コムギ(TYLERら, 1981)やライムギ(CLOUTIERら, 1982)の耐凍性を増加させた。シロイヌナズナでも水ストレスによる耐凍性の増加が報告されているが(MÄNTYLÄら, 1995)、彼らの結果では水分欠乏状態で得られた耐凍性は、低温処理によるものと同程度であった。一方、CLOUTIERら(1984)は、コムギとライムギでは乾燥ストレスによって低温順化で得られる場合と同じレベルの耐凍性となったが、乾燥ストレスを与えたオオムギとエ

Table 1 Freezing tolerance indicated with electrolyte leakage from leaves of cabbage seedlings at 3-leaf stage, grown at a normal temperature (20/15°C) for 3 days (Nor) and at a low temperature (5°C) for 7 days (Low).

	Initial ^z	Nor	Low
Electrolyte leakage at -4°C test (%)	88.2 ± 9.2^y	92.3 ± 1.2	23.2 ± 7.2

z: 2-leaf stage, immediately before the treatments.

y: Values are means ± standard errors (4 replications).

Table 2 Effects of water stress on freezing tolerance of cabbage seedlings.

Treatment	Electrolyte leakage (%)			
	Freezing test			
	-2°C	-4°C	-6°C	-8°C
C ^z	43.5 ± 3.1^y	86.3 ± 1.3	93.6 ± 0.3	84.2 ± 15.8
NW	23.0 ± 2.1	70.2 ± 5.7	84.6 ± 3.5	83.8 ± 10.5

z: C, watered (more than 40 ml pot⁻¹ day⁻¹); NW, not watered.

y: Values are means ± standard errors (3 replications).

Freezing tolerance is expressed in terms of the percentage of electrolyte leakage from leaves after freezing test at -2°C, at -4°C, at -6°C and at -8°C.

ンバクの耐凍性は、低温順化で得られるレベルに達しないことを報告している。本実験でも、キャベツ幼植物で水ストレスによる耐凍性の増加はそれほど明瞭なものではなかった。こうした不一致は植物の種類による乾燥耐性の違いや水ストレスを与える処理方法の違いなどが関係していると思われる。

5 要約

キャベツの耐凍性機構と環境要因の関係を明らかにするために、キャベツ幼植物の生長と耐凍性に及ぼす低温順化の効果と水ストレスの影響を調べた。

キャベツ幼植物は、5°Cの低温順化処理中にも緩やかながら生長を続け、処理3日目には、耐凍性が獲得されるようになり、-6°Cでの凍結・融解後でも生存する個体が確認された。低温順化処理期間の経過とともに生存率は上昇し、耐凍性が増加した。しかし、20/15°Cの生育適温でキャベツ幼植物の生育ステージが進んだ場合には、-4°Cでの凍結試験による電解質漏出程度は大きいままであり、耐凍性は増加しなかった。したがって、キャベツ幼植物の耐凍性が増加したのは、生育ステージの進行によるものではなく、5°Cの非凍結低温に遭遇することによる低温順化であることが明らかとなった。

一方、キャベツ幼植物に生育適温で灌水制限によって水ストレスを与えると、耐凍性を増加する傾向がうかがわれたものの、低温順化による耐凍性の増加に比較するとわずかであった。

II 低温順化と脱順化の解析

1 緒言

植物の耐凍性機構には、低温順化により獲得された耐凍性が、一定以上の温度域に遭遇することによって消失してしまう脱順化という現象も関わっている。木本性植物では冬から春にかけてみられる季節変動であり、その直後には急速な生長が進む。MOHAPATRAら(1987)は、17日間順化させたアルファルファでは、2日間の脱順化で耐凍性が減少することを報告している。脱順化によってこのように短期間で耐凍性を失うとすれば、凍霜害の被害を減らすためには、低温順化現象とともに脱順化現象について解明することが重要であると考えられる。

第I章でキャベツ幼植物では生育温度を5°Cとすることで低温順化して耐凍性が獲得されたことを示したが、低温順化に及ぼす温度以外の要因の影響や脱順化の詳細について明らかになっていない。また、そのような低温

順化・脱順化時に他の環境要因が関わっているのかを調べることは、実際のキャベツ栽培環境での耐凍性を考える上で重要である。本章では、キャベツの低温順化・脱順化時の耐凍性の変化について明らかにし、次いで低温順化・脱順化時の光や水ストレスが耐凍性に及ぼす影響について検討した。

2 材料および方法

a 実験1. 低温順化・脱順化処理が耐凍性に及ぼす影響

キャベツ品種‘晩抽理想’を供試した。培養土を詰めたプラスチックポットに播種し、20/15°C(昼/夜)、12時間日長のグロースチャンバーで生育させた。メタルハライドランプを光源とし、光強度は約 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ とした。播種3週間後に5°Cのグロースチャンバーで10日間低温順化処理を行い耐凍性を評価した。脱順化については、光強度約 $240 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ とした以外は、第I章の実験1と同じ条件で7日間低温順化した幼植物を20/15°Cのグロースチャンバーに戻して脱順化処理を行い、耐凍性を評価した。耐凍性は第I章で述べた方法で電解質漏出程度を測定し、その際の凍結温度は-4から-8°Cまでの間で適宜設定した。

b 実験2. 低温順化・脱順化時の光条件が耐凍性に及ぼす影響

低温順化時の耐凍性の変化に及ぼす光の関与について調べるため、実験1と同様に20/15°Cで生育させた播種3週間後のキャベツ幼植物を用い、低温順化処理として5°Cの温度条件下で、0(暗条件)あるいは12時間日長下(光強度約 $230 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)に7日間おいて耐凍性を評価した。また、脱順化時についても処理中の光の影響を調査した。5°Cで12時間日長に7日間おいて低温順化させた幼植物を、脱順化処理として20/15°Cのグロースチャンバーに2日間おき、日長は0(暗条件)あるいは12時間(光強度約 $230 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)として耐凍性を評価した。耐凍性の評価方法は実験1と同様とした。

c 実験3. 低温順化・脱順化時の土壤水分制限が耐凍性に及ぼす影響

実験1と同様に20/15°Cで生育させた播種3週間後のキャベツ幼植物を用いた。ただし、光強度は約 $230 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ とした。低温順化開始時までは適宜灌水を行った。播種3週間後、第2葉展開時に幼植物を5°C(同上の光条件)のグロースチャンバーに移し、7日間生育させて低温順化期間とした。低温順化期間中毎日灌水する区(WA)、低温順化期間の最後1日だけ灌水す

る区 (RA), 無灌水区 (NA) を設けた。脱順化处理は、低温順化处理終了後に幼植物を1日間20°C暗条件下に移して行った。脱順化处理時の灌水処理区として、低温順化時から継続して毎日灌水する区 (WDW), 低温順化時から灌水せずに脱順化中も無灌水の区 (NDN), 脱順化中だけ灌水する区 (NDW) とした。1日当たりの灌水量は、1ポット当たり40ml以上とした。なお、低温順化前を対照区 (C) とした。耐凍性については、実験1と同様の方法で各処理終了時に評価した。植物体地上部の水分含量は、新鮮重と乾物重の差を乾物重で割った値で表した (FENNELら, 1990)。土壌含水率は、植物の耐凍性を評価する直前に測定した。

d 実験4. 短時間脱順化处理が耐凍性に及ぼす影響

実験1と同様に育て、播種後22日目から5°Cで8日間低温順化させた幼植物を用い、暗条件下で15, 20, 25°Cの温度で12時間脱順化处理を行い、処理開始から0, 3, 6, 12時間後の耐凍性を評価した。耐凍性の評価方法は実験1と同様とした。

3 結果

a 実験1. 低温順化・脱順化处理が耐凍性に及ぼす影響

5°Cの低温処理開始前の幼植物では、-4°Cの凍結試験で電解質漏出程度が92%以上となった (図-7)。5°C処理

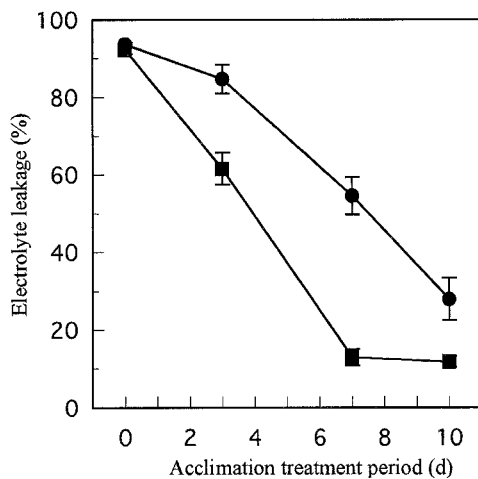


Fig. 7 Freezing tolerance of leaves of cabbage seedlings during exposure to low temperature (5°C). Freezing tolerance is expressed by percentage of electrolyte leakage from leaves after a freezing test. ■, freezing at -4°C; ●, freezing at -6°C. Vertical bars indicate standard errors (n=3).

条件下に置いた日数が長くなるにしたがって電解質漏出程度は減少し、低温順化10日後には、-4°Cの凍結処理試験での電解質漏出程度は11.8%まで、-6°Cの凍結処理試験でも27.9%まで減少し、耐凍性の増加が確認された。

脱順化处理に先立ち低温順化处理を7日間行ったところ、-5°Cの凍結試験による電解質漏出程度が、低温順化处理前の91.1%から、56.6%まで減少したが (図-8)、1日間20/15°C条件下に戻すことで電解質漏出程度が92.4%まで増加した。

b 実験2. 低温順化・脱順化時の光条件が耐凍性に及ぼす影響

低温順化・脱順化時の耐凍性に及ぼす光の関与について調査した結果を表-3に示す。低温順化处理をしていない対照区は-4°C以下の凍結処理で電解質漏出程度が大きかった。12時間日長条件下で5°C処理した区 (L-A) では、全ての凍結処理温度で対照区よりも電解質漏出程度が小さく、-6°Cの凍結処理でも48.0%であった。しかし、暗条件下で5°C処理した区 (D-A) では、-4°Cの凍結処理で電解質漏出程度が98.3%と大きな値を示し、凍結・融解による傷害を受けた。このことから、5°Cの低温だけでは耐凍性が増加せず、低温順化には光が必要であることが明らかとなった。一方、低温順化した植物を20/15°Cで脱順化处理すると、-4°Cの凍結処理後の電解質漏出程度が、暗条件下 (D-D) では83.7%、12

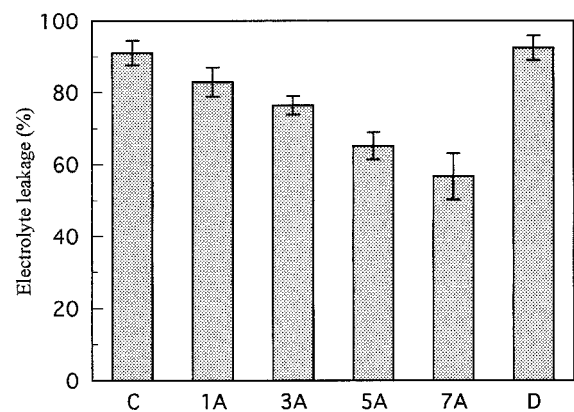


Fig. 8 Effect of cold acclimation and deacclimation on freezing tolerance of cabbage leaves. Freezing tolerance is expressed by percentage of electrolyte leakage from leaves after a freezing test at -5°C. C, control; 1A, cold acclimation for 1 day; 3A, cold acclimation for 3 days; 5A, cold acclimation for 5 day; 7A, cold acclimation for 7 days; D, 1 day deacclimation after 7 days cold acclimation. Vertical bars indicate standard errors (n=9).

Table 3 Effects of light during cold acclimation and deacclimation treatments on freezing tolerance of cabbage seedling.

	Electrolyte leakage (%)			
	Freezing test at			
	-2°C	-4°C	-6°C	-8°C
C ^z	10.3±1.9 ^y	85.7±7.1	97.2±2.8	99.9±2.6
L-A	7.2±1.7	27.4±7.1	48.0±8.1	90.1±5.6
D-A	32.0±3.3	98.3±1.2	98.9±3.7	100.0±0.7
L-D	12.3±1.8	70.4±5.2	93.5±3.9	100.0±0.0
D-D	21.9±1.3	83.7±10.5	82.0±12.1	98.6±0.7

^z: C, control; L-A, cold acclimation treatment (5°C) under 12 h photoperiod; D-A, cold acclimation treatment under 0 h photoperiod; L-D, cold acclimation under 12 h photoperiod followed by deacclimation treatment (20/15°C) under 12 h photoperiod; D-D, cold acclimation under 12 h photoperiod followed by deacclimation treatment under 0 h photoperiod.

^y: Values are means ± standard errors (3 replications).

Freezing tolerance is expressed in terms of the percentage of electrolyte leakage from leaves after freezing test at -2°C, at -4°C, at -6°C, and at -8°C.

時間日長条件下 (L-D) でも 70.4%となっており, 耐凍性が減少して脱順化された。したがって, 低温順化と違って脱順化には必ずしも光を必要としないことが明らかとなった。

c 実験 3. 低温順化・脱順化時の土壌水分制限が耐凍性に及ぼす影響

各処理区の土壌含水率は, 対照区で 44.2±2.7%, WA 区は 46.9±2.2%, WDW 区は 51.2±0.7%, NA 区は 21.4±1.5%, RA 区は 47.1±0.9%, NDN 区は 22.3±1.9%, NDW 区は 47.3±0.7%であった。低温順化前のキャベツ幼植物における地上部の水分含量は 13.21g H₂O/g DW であったが, 十分な灌水を行いながらでも低温順化中に 7.53g H₂O/g DW と顕著に減少した (表-4)。無灌水で低温順化した区 (NA) の幼植物の水分含量は, 十分に灌水した区 (WA) よりもさらに少なかった。NA 区の葉は萎凋がみられ, 灌水制限が植物体に水ストレスを与えていることを示しており, 植物の生育は抑制された。低温順化中に水ストレスを与えていても灌水を再開した場合には (RA) 水分含量は増加した。

耐凍性への影響を表-5 に示す。低温順化処理前である対照区は -4°C の凍結処理でも電解質漏出程度が大きかった。灌水しながら低温順化した区 (WA) では, 全ての凍結処理で電解質漏出程度が対照区より小さく, 低温順化処理で耐凍性が増加したことを示していた。さらに, 同じ 5°C の低温処理を行った場合でも, -8°C の凍結処理では NA 区の電解質漏出程度は 39.93%であったが, WA 区では 71.37%と大きな値であり, WA 区に比べて NA 区の方が耐凍性がより増加していた。このように低温順化時の灌水制限による水ストレスは, 耐凍性の

Table 4 Effects of water stress on water contents of shoots of cabbage seedlings.

Treatment	Water content
	(g H ₂ O/g Dry Weight)
C ^z	13.21±0.11 a ^y
WA	7.53±0.07 c
NA	6.60±0.02 d
RA	7.36±0.09 cd
WDW	10.34±0.09 b
NDW	9.82±0.23 b
NDN	8.19±1.01 c

^z: C, control of watering and before cold acclimation; WA, watering cold acclimation; NA, non-watering cold acclimation; RA, rewatered 1 day before the end of cold acclimation; WDW, watering cold acclimation followed by watering deacclimation; NDW, non-watering cold acclimation followed by watering deacclimation; NDN, non-watering cold acclimation followed by non-watering deacclimation.

^y: Values are means ± standard errors (3 replications). Means indicated by different letters are significantly different (0.01 level) by LSD.

増加を促進した。一方, 低温順化中に灌水を再開させた RA 区では低温順化期間の最終日 1 日のみの灌水だったにもかかわらず, 耐凍性が低温順化中灌水した WA 区で得られたレベルとほぼ同程度まで減少した。

脱順化処理についてみると, 低温順化中に十分灌水した幼植物においても脱順化処理することで水分含量がさらに増加した。低温順化中に灌水制限した後で, 脱順化時に灌水した NDW 区と灌水しない NDN 区は, それぞれ 9.82, 8.19g H₂O/g DW と両方とも水分含量は増加したが, NDW 区の水分含量の方がより多かった。

脱順化後の耐凍性では、低温順化及び脱順化処理期間中ずっと灌水したWDW区の-4℃の凍結処理による電解質漏出程度は増加した。灌水せずに脱順化処理したNDN区では、-4、-6℃の凍結処理でそれぞれ24.69、27.61%と脱順化時に灌水したNDW区に比べて小さな値のままであり、脱順化による耐凍性の減少が抑制された。

d 実験4. 短時間脱順化処理が耐凍性に及ぼす影響

8日間5℃で低温順化処理した幼植物に対して、温度を変えて0から12時間の脱順化処理を行った。脱順化開始前は、-4、-6、-8℃の凍結処理による電解質漏出程度20.8、38.4、39.1%で示される耐凍性となっていた。ここから15、20、25℃の各温度で脱順化処理を行ったところ、最も温度の高い25℃処理で3時間、温度の低い15℃処理でも6時間程度で電解質漏出程度が増加がみられ、脱順化処理温度が高いほど、短時間の処

理で電解質漏出程度が増加し、耐凍性の減少が認められた(図-9)。そして脱順化処理12時間後には、全ての脱順化処理温度で-8℃凍結処理後の電解質漏出程度が85%以上となった。これらのことから、耐凍性は比較的短時間の脱順化によっても減少すること、脱順化の程度は温度に依存することが示された。

4 考察

キャベツ幼植物は低温順化によって耐凍性を獲得したが、非凍結低温から生育適温に戻すことで、耐凍性が速やかに消失した。こうした結果は、他の植物で報告された脱順化の様相と一致している(GUYら, 1987; MOHAPATRAら, 1988)。

低温順化に関して、暗条件下では非凍結低温で処理してもキャベツ幼植物の耐凍性は獲得されなかった。播種

Table 5 Effects of water stress on electrolyte leakage of cabbage leaves. Freezing tolerance is expressed in terms percentage electrolyte leakage from leaves after freezing test at -4℃, at -6℃, and at -8℃. The treatments are the same as those in Table 4.

Treatment	Electrolyte leakage (%)		
	Freezing test at		
	-4℃	-6℃	-8℃
C	87.87±0.88 a ^z	94.05±0.89 a	92.76±0.17 a
WA	34.33±3.96 c	58.65±9.45 b	71.37±3.60 b
NA	26.46±1.81 c	32.06±5.18 c	39.93±4.56 c
RA	26.24±6.67 c	58.02±4.98 b	85.11±1.07 a
WDW	52.81±2.47 b	70.88±3.89 b	83.91±2.28 a
NDW	44.90±2.45 b	75.81±4.15 ab	90.21±2.62 a
NDN	24.69±2.60 c	27.61±4.73 c	61.49±7.58 b

^z: Values are means ± standard errors (3 replications). Means indicated by different letters within a column are significantly different at (0.01 level) by LSD.

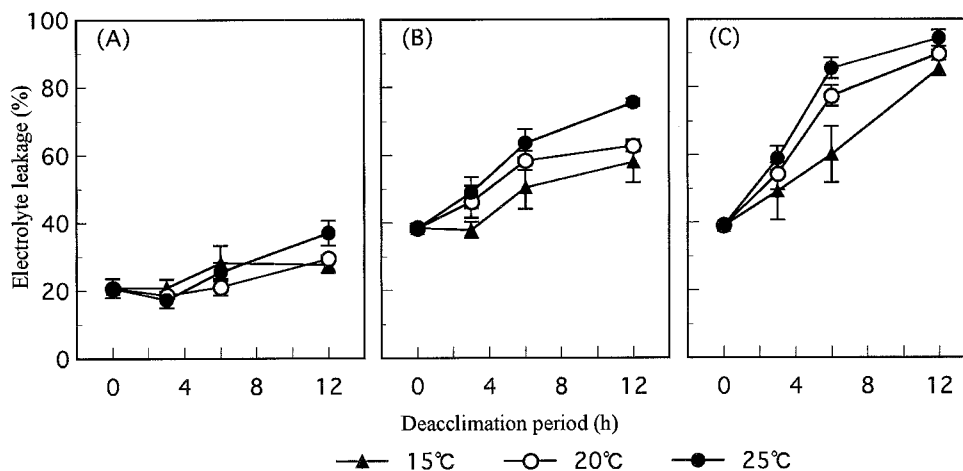


Fig. 9 Effect of short-term deacclimation on freezing tolerance of cabbage leaves. Freezing tolerance test at -4℃ (A), -6℃ (B) and -8℃ (C). Vertical bars indicate standard errors (n=4).

後6週間以上のキャベツを用いたCoxら(1976)の実験でも、低温下で光なしにはほとんど低温順化されなかった。GRIFFITHら(1993)は、冬ライムギでの耐凍性の獲得は、同化産物量を左右する光量に依存していることを報告している。これらから、暗条件下で低温処理したキャベツ幼植物が耐凍性を獲得できなかったのは、光合成産物の不足が関係しているのではないかと考えられる。一方、低温順化による十分な耐凍性の獲得には光が必要であったが、低温順化されたキャベツ幼植物は光の有無に関わらず脱順化処理で耐凍性が失われた。このことから、キャベツ幼植物の脱順化には光があまり関与しないことが明らかとなった。

多くの植物では、水ストレスにより耐凍性が誘導されている(STOUT, 1980; TYLERら, 1981; CLOUTIERら, 1982)。コムギでは水ストレスによって -15°C の LT_{50} (50%致死温度)、ライムギでは -29°C の LT_{50} が得られている(CLOUTIERら, 1984)。キャベツ幼植物でも、生育適温条件下で水ストレスを与えた場合にはその傾向はうかがわれたものの大きな耐凍性の増加は認められなかった(第1章)。これに対して低温順化・脱順化時の水ストレスは、生育適温の場合よりも顕著に耐凍性への影響がみられた。低温順化中の灌水制限による水ストレスが、植物体内の水分含量の減少を伴いながら耐凍性を増加させることが示された。このことは、低温順化時あるいは水ストレス時における水分含量の減少が、コムギ(LIMINら, 1985)とアルファルファ(STOUT, 1980)における耐凍性の増加に相関があるという報告に合致するものであった。しかし、ホウレンソウの根を低温にさらしたときには耐凍性と組織の含水量の間に一定の関係がみられなかったとする報告もある(FENNELLら, 1990)。植物体内の水分含量と耐凍性の関係を明らかにするためには、自由水や結合水の識別をする必要があるのかもしれない。

実験3の結果から低温順化中あるいは脱順化中の灌水は耐凍性を減少させた。対照的に低温順化から引き続いた脱順化時の水ストレスは、脱順化に伴う耐凍性の減少を軽減させた。このような結果から、低温順化そして脱順化中にも耐凍性は植物の水分状態によって大きく影響を受けることが明らかとなり、脱順化時の水ストレスは脱順化による耐凍性の減少を抑制できることが示唆された。

キャベツ幼植物では、7日間の低温順化で増加した耐凍性が1日間の脱順化で消失した(図-8)。さらに数時間単位で脱順化処理を行った結果、3から6時間の20および 25°C 処理で耐凍性が減少し始めた(図-9)。低温

順化に必要な時間よりも短時間に脱順化が引き起こされるということは、自然環境下でも一時的な気温の上昇によって耐凍性が低下し、凍霜害を受けやすくなる可能性がある。キャベツの凍害はしばしば真冬よりも春に発生することがあり(吉川ら, 1979)、凍害防止には脱順化という現象について解明することも重要であると考えられる。

5 要約

低温順化・脱順化時の耐凍性の変化について明らかにし、次いで低温順化・脱順化時の光や水ストレスが耐凍性に及ぼす影響、短時間の脱順化処理が耐凍性に及ぼす影響について検討した。

7日間 5°C 処理をすることで低温順化したキャベツ幼植物は、1日間生育適温($20/15^{\circ}\text{C}$)に戻すことで速やかに耐凍性を消失し、脱順化することが確認された。 5°C の非凍結低温にキャベツ幼植物を遭遇させても、暗条件下では耐凍性が増すことがなく、低温順化には、非凍結低温以外に光も必要であった。一方脱順化においては、光の有無に関わらず生育適温に戻すことで耐凍性が消失したことから、必ずしも光を必要としないことが明らかとなった。

低温順化・脱順化時に灌水制限によってキャベツ幼植物に水ストレスを与えると、耐凍性に対して影響がみられた。 5°C の低温順化処理時に、灌水制限による水ストレスを与えるとさらに耐凍性が増加したが、低温順化処理中に灌水を再開すると、灌水制限を行わなかったものと同じレベルの耐凍性にまで減少した。灌水制限したまま脱順化処理した場合、脱順化処理時に灌水したものに比べて耐凍性が減少せず維持されており、脱順化処理時の水ストレスは、脱順化による耐凍性の減少を抑制した。これらのことから、植物の耐凍性を増加させる、あるいは脱順化を抑制して耐凍性を維持するには、水ストレスを与えることも有効であることが示唆された。

脱順化による耐凍性の減少は、低温順化による増加に比べて速やかに引き起こされ、暗条件下 25°C の温度処理では3時間程度で耐凍性が減少し始め、 15°C の温度処理によっても6時間程度で耐凍性への影響が認められた。以上の結果より、数時間単位の脱順化処理によっても耐凍性は減少すること、脱順化の程度は温度に依存し温度が高いほど耐凍性の減少が早いことが明らかとなった。これらのことから、自然環境下でも一時的な葉温上昇などによってキャベツの耐凍性が減少し、凍霜害が引き起こされる可能性のあることが示唆された。

Ⅲ 冬季栽培のキャベツ結球葉における脱順化の解析

1 緒言

越冬性植物の耐凍性には、温度と水分、光など多くの環境要因が影響を及ぼすことが知られている (BURKEら, 1976; TYLERら, 1981). それらの中で最も大きな要因のひとつが温度である。植物は生育期間に低温にさらされることで低温順化し、温度の上昇により脱順化される。著者は第Ⅱ章においてキャベツ幼植物では5°C処理で低温順化され耐凍性が獲得されることを示した。また、この獲得された耐凍性は低温順化に必要な時間よりも短時間で脱順化されて消失し、3時間程度の昇温によってもある程度の耐凍性の減少が起こることを確認した。そのため、自然環境下でも一時的な気温の上昇によって耐凍性が減少し、凍害を受けやすくなる可能性が考えられる。また、キャベツでは冬の寒害よりも春先の凍霜害の方が多くの被害を発生させる場合もある (吉川ら, 1979). これらのことから、圃場では耐凍性の減少、つまり脱順化が被害を大きくしている可能性があり、保温技術などによって凍霜害を防ぐだけでなく、生長を再開させるべき時期までは脱順化を抑制するという点も被害を減らすために重要と考えられる。しかし、圃場での耐凍性と温度の関係については、凍結を引き起こす最低気温領域やそれらを直接的に防ぐための保温という観点からの研究が多く (五十嵐ら, 1989; 中川ら, 1983), 脱順化過程についての解明は進んでいない。そこで本章では、結球時のキャベツを材料に圃場における短期間の脱順化の発生や葉温と耐凍性の関係について調べ、遮光処理による脱順化の防止について検討を行った。

2 材料および方法

a 実験1. 日中の葉温変化と脱順化の関係

キャベツ品種‘晩抽理想’を培養土を詰めた128穴セル成型トレイに播種し、20/15°C (昼/夜)、光強度 $230 \pm 10 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、12時間日長の人工気象室内で育苗した。光源にはメタルハライドランプを用いた。1996年8月26日に播種し、同年9月25日に農林水産省野菜・茶業試験場の圃場に定植した。晴天日であった1997年2月24日に結球部に他の個体の外葉が重なっていない個体を選び、結球部の表面にあたる葉 (以下表葉) および表葉から3枚目の葉 (以下内葉) の向軸側温度および地上約35cmの気温をアルミ箔で覆った熱電対 (銅-コン

スタンタン線) で測定した。表葉と内葉を24日午前9時と午後4時にサンプリングして直ちに電解質漏出程度を測定した。すなわち、中肋を除いた葉身中央付近から切り出した葉片 (直径12mm) に小さな氷片と脱イオン水のスプレーによって植氷し、耐凍性の程度に応じて差が明瞭となるよう-10、-14および-18°Cに遭遇させた後、葉片を15mlの脱イオン水に浸漬して電気伝導度を測定した。各凍結処理温度ごとに4反復の電解質漏出程度で耐凍性を調べた。

b 実験2. キャベツ葉の耐凍性と日中の平均葉温の関係

1997年8月16日に播種後、実験1と同様の条件で育苗し、同年9月18日に定植したキャベツを供試した。1998年1月26日、2月2、5、10日に内葉の向軸側温度を午前9時から午後6時にかけて熱電対で測定し、午後4時にサンプリングして実験1と同様に電解質漏出程度を測定した。

c 実験3. 遮光処理が葉温と脱順化に及ぼす影響

1997年8月25日に播種し、実験1と同様の環境条件下で生育させたキャベツ苗を同年9月22日に定植した。晴天日を選び、1998年2月13日の午前9時から午後4時まで遮光処理としてアルミ箔で覆ったボール紙製円錐状キャップ (図-10) をキャベツ結球部分に被せた。地上約35cmの気温および無処理と遮光処理したキャベツで内葉の向軸側温度を熱電対で測定した。葉の耐凍性の評価は、27日午前9時と午後4時にサンプリングして実験1と同様に電解質漏出程度を測定して行った。

d 実験4. 寒冷紗による短期間の遮光処理が耐凍性に及ぼす影響

実験1と同様の環境条件下で1997年8月26日に播種し、9月29日に定植したキャベツを用い、1998年2月

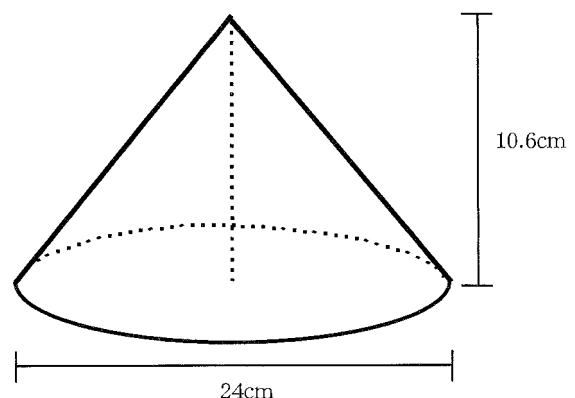


Fig.10 Scheme of funnelled cap for shading.

26日から3月4日まで寒冷紗を2重に浮き掛けし(遮光率約69%), 内葉の向軸側温度と耐凍性の変化を調べた。耐凍性の評価は実験1と同様に電解質漏出程度を測定することで行ったが、凍結処理は-8, -10および-14°Cとして測定した。

3 結果

a 実験1. 日中の葉温変化と脱順化の関係

1997年2月24日は、キャベツの結球部の表面が直達

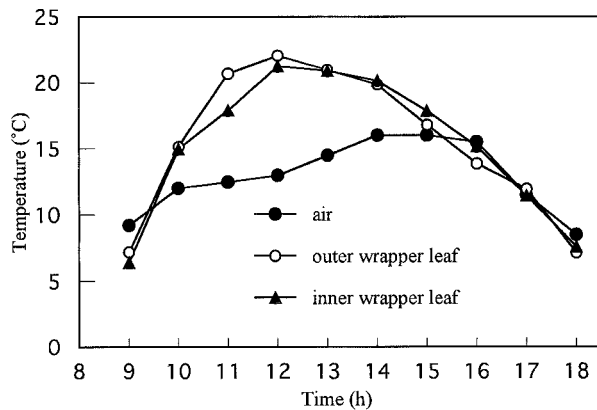


Fig.11 Leaf and air temperatures during the day (24 February 1997).

光にさらされており、そのため図-11のように日中の表葉と内葉の葉温は気温よりも高温で推移し、どちらも午前10時から5時間は15°C以上となった。気温は最高で16°Cであったのに対して、表葉と内葉ではそれぞれ22, 21°C以上であった。表葉では-18°Cの凍結処理後の電解質漏出程度が、24日午前9時に比べて午後4時で増加しており(図-12, A), 耐凍性が減少した。内葉では-14, -18°Cの凍結処理後の電解質漏出程度が午後4時の方で増加し(図-12, B), 耐凍性の減少がみられた。日中に高温となった結球部表面付近の葉では、耐凍性が減少していることが明らかとなった。

b 実験2. キャベツ葉の耐凍性と日中の平均葉温の関係

晴天が続いた1998年1月26日から2月10日にかけて実験を行った。1月26日, 2月2, 5, 10日にそれぞれ異なる個体で、午前9時から午後4時までの平均内葉温度と午後4時の内葉の耐凍性との関係を調べた。2月2日では-14°C凍結処理後の電解質漏出程度と平均葉温との間に有意な正の相関($r=0.82^{**}$)が認められ(表-6), 2月5, 10日には-18°C凍結処理後の値と平均葉温の間に有意な正の相関関係が認められ($r=0.79^{**}$, $r=0.63^{*}$), 日中の葉温が高いほど耐凍性が低い傾向にあることが示

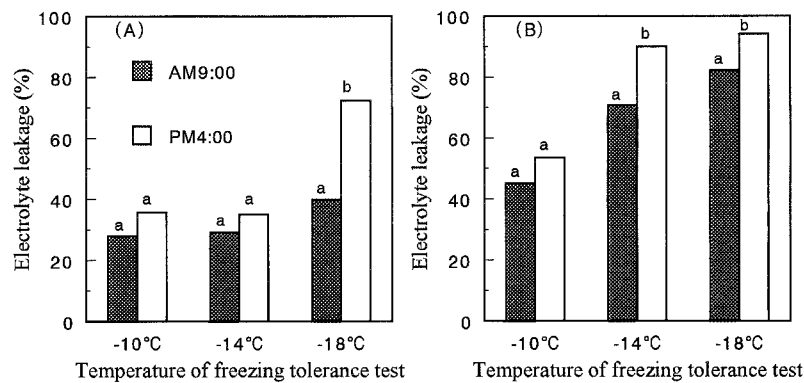


Fig.12 Changes in freezing tolerance of the cabbage leaves, (A) outer wrapper leaf; (B) inner wrapper leaf. Date points within each freezing tolerance test with different letters show significant differences at the 5% level.

Table 6 Regression coefficients between average leaf temperature (9: 00 a.m. - 4: 00 p.m.) and electrolyte leakage after freezing test in cabbage leaves.

Freezing at	date in 1998			
	1/26	2/2	2/5	2/10
-10°C	$r=0.46$	$r=0.50$	$r=0.57^{zz}$	$r=0.14$
-14°C	$r=0.49$	$r=0.82^{**}$	$r=0.48$	$r=0.38$
-18°C	$r=0.21$	$r=0.75^{*}$	$r=0.79^{**}$	$r=0.63^{*}$
	(n=10)	(n=10)	(n=11)	(n=11)

z: Significantly different at the 5% level (*), at the 1% level (**).

された。1月26日は、有意な相関は認められなかった。

c 実験3. 遮光処理が葉温と脱順化に及ぼす影響

1998年2月13日は日中の気温が13℃から23℃まで変化し、無処理区の葉温は正午を中心に気温よりも高く推移して最高で28℃に達した(図-13)。一方、結球部分にキャップを被せて遮光処理をしたキャベツの葉温は気温よりも低く、最高でも19℃であり、無処理区との温度差は大きかった。

耐凍性についての測定結果を図-14に示す。無処理区では-10℃の凍結処理後の電解質漏出程度が、午前9時に比べて午後4時には増加しており耐凍性の減少がみられた。しかし、遮光処理区ではほとんど午前9時の値と変化しておらず、無処理区でみられたような脱順化は抑制されていた。-14℃あるいは-18℃での凍結処理では、電解質漏出程度に有意な差が認められなかった。

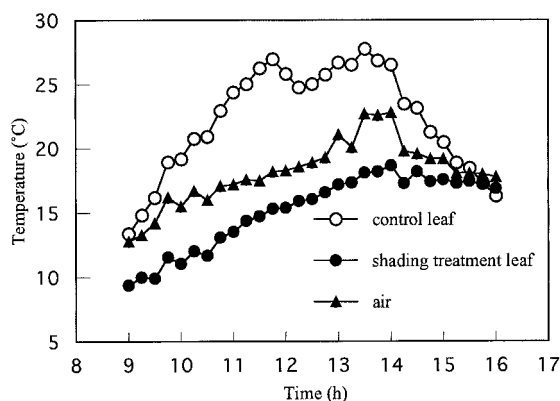


Fig.13 Effect of shading treatment on leaf temperatures.

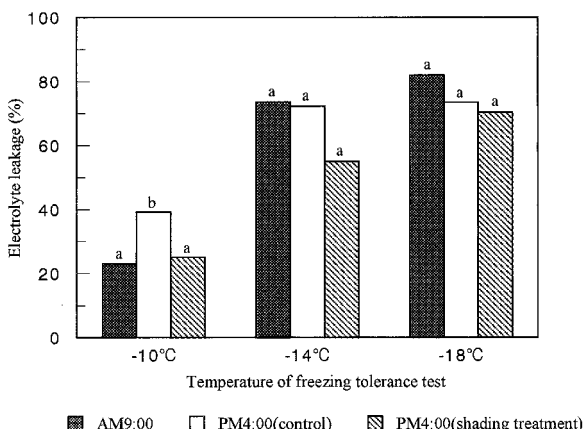


Fig.14 Effect of shading treatment on freezing tolerance of cabbage leaves. Date points within each freezing tolerance test with different letters show significant differences at the 5% level.

d 実験4. 寒冷紗による短期間の遮光処理が耐凍性に及ぼす影響

2重の寒冷紗を浮き掛けして6日間遮光処理した場合には、日中は無処理区の葉温が遮光処理区よりも高く、逆に夜から朝にかけて低くなった(図-15)。無処理区では最高葉温が28℃を越えた日があったが、遮光処理区では最高で20℃程度であった。無処理区では2月26日と3月4日の電解質漏出程度に有意な差はみられなかったが、遮光処理区では-8℃での凍結処理で電解質漏出程度が減少しており、耐凍性が増加する傾向がみられた(図-16)。

4 考察

耐凍性を獲得する低温順化に比べて脱順化は速やかに引き起こされることは既に報告されており、17日間低温順化

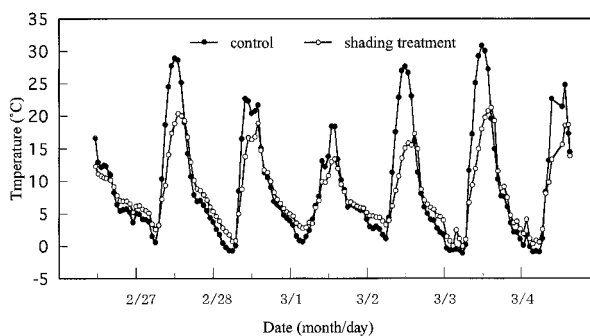


Fig.15 Effect of shading by cover material on leaf temperature of cabbage.

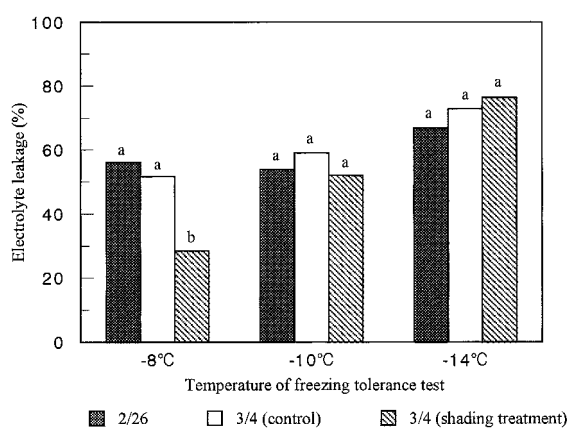


Fig.16 Effect of shading by cover material on freezing tolerance of cabbage leaves. Date points within each freezing tolerance test with different letters show significant differences at the 5% level.

したアルファルファの苗は -10°C での凍結処理後の生存率がほぼ100%となったが、 20°C 処理2日間の脱順化によって低温順化前のレベルとなった(MOHAPATRAら, 1987). 著者は第II章においてキャベツ幼植物では1週間以内の非凍結低温処理で耐凍性が獲得され、1日間の脱順化で耐凍性は消失し、 25°C の温度処理では3時間程度でも耐凍性に影響を及ぼすことを示した. 本章の実験1で1997年2月24日に圃場でキャベツ結球部表面付近の葉温を測定したところ、 15°C 以上で5時間程度経過していた. 午前9時と午後4時の耐凍性を比較すると、表葉と内葉の両方で耐凍性が減少していることが示された. 冬期間であっても日射が当たることでキャベツの結球部表面付近の葉温は気温よりも高温になっており、圃場において高温下で脱順化が引き起こされている可能性が示された. ただし、圃場での結球時のキャベツが持っている耐凍性の程度はかなり高いため、その耐凍性が短時間に完全に消失してしまうことはないと考えられる. また、実験2の1998年1月26日の測定結果のように、日中のキャベツの平均葉温と耐凍性に有意な相関がない晴天日もあり、それ以前の前歴温度の影響や水分ストレスなどの環境要因(BURROWSら, 1989)も関係している可能性が示唆される.

冬期間でも晴天日には結球しているキャベツの結球部表面付近の葉温が高くなり、それに伴ってある程度の脱順化が引き起こされている可能性があることが示されたが、これに対して、日射を遮って葉温の上昇を抑制することで脱順化を軽減できる可能性がうかがわれた. 被覆資材による寒害の防止効果に関しては、保温、特に夜から朝にかけての温度について報告されている(五十嵐ら, 1989; 中川ら, 1983). 脱順化を防止して植物が獲得している耐凍性を維持するという観点から考えると、日中の温度上昇にも考慮することがさらなる凍霜害防止に役立つものと思われる.

実験4で寒冷紗を用いて6日間行った遮光処理では耐凍性が増加する傾向がうかがわれており、脱順化の抑制による凍霜害の軽減に役立つ可能性が認められたものの、予備試験で行った遮光程度が強い4重の寒冷紗による遮光処理では遮光処理しない場合と同程度の耐凍性となった. キャベツは低温により糖質の蓄積が促進される. しかし、FLOREら(1983)は遮光処理によって植物体内の可溶性炭水化物が減少することを報告しており、また、耐凍性には可溶性糖類が関与しているため(PERRASら, 1984; GUYら, 1992)、長期間の遮光処理による糖質の減少が耐凍性の減少を引き起こす可能性も懸念される.

以上の結果から、冬期間の結球時のキャベツは晴天時に結球部への直達光により結球部表面付近の葉温が高温となることで結球部表面付近の葉で脱順化が引き起こされる可能性があることが明らかとなった.

5 要約

圃場におけるキャベツの結球部表面付近の葉は、冬期間も日射などの条件によって一時的に高温になることが予想される. そこで、冬期間のキャベツにおいて葉温の上昇と脱順化の関係について検討し、遮光処理が葉温と耐凍性に及ぼす影響について調べた.

晴天であった1997年2月24日は、キャベツ結球部表面付近の葉温が一時的に気温よりも 10°C 以上高くなり最高で 22°C に達した. 結球部表面付近の葉の耐凍性は午前9時よりも午後4時の方が減少し、脱順化が起きている可能性が示された. さらに多くの個体を用い数日間の葉温と耐凍性との関係を調べたところ、一部の日を除くと晴天日には個体ごとの日中の平均葉温が高いほど午後4時における耐凍性の程度が低い傾向がみられ、日中の葉温上昇が耐凍性を減少させている可能性が確認された. 遮光処理に関しては、晴天であった1998年2月13日には無処理区のキャベツでは葉温が最高で 28°C 以上にまで上昇したが、遮光処理区の葉温は日中には無処理区より低温で推移した. 耐凍性は遮光処理区では無処理区ほどは減少せず、脱順化が抑制される可能性が示された. さらに、寒冷紗を用いて6日間連続で遮光処理(遮光率約69%)すると、無処理区のキャベツに比べて耐凍性の向上がうかがわれた. 以上の結果から、冬期間の圃場で結球しているキャベツでは、晴天時に結球部への直達光が結球部表面付近の葉温を上昇させて結球部表面付近の葉で脱順化を引き起こす可能性のあることが明らかとなり、こうした晴天時の日射による葉温上昇が引き起こす短期間の脱順化は、一時的な遮光によって抑制しうることが示唆された.

IV 糖蓄積と耐凍性機構の関係

1 緒言

耐凍性機構には、様々な物質が関与していると考えられており、低温順化時には炭水化物やアミノ酸、グリシンベタイン、ポリアミンの蓄積などの生化学的変化がみられる(JUNGら, 1961; PERRASら, 1984; ALBERDIRAら, 1991). その中でも、糖質は耐凍性に関わる最も重要な要因のひとつと考えられている. 木本性植物では夏が終

わるとデンプンが蓄積し、その後気温の低下につれて減少し、秋から冬にかけて耐凍性の増加にしたがって可溶性糖質が蓄積する (SAKAIら, 1968). コムギ (PERRASら, 1984) やホウレンソウ (GUYら, 1992) などでは、糖含量の変化と耐凍性との間に相関がみられている。キイチゴの蕾では可溶性糖含量と LT_{50} に相関関係 ($r=0.80$) があり、特にスクロース含量と LT_{50} では $r=0.86$ の相関係数が得られたことが報告されている (KAURINら, 1981). 対照的に POLLOCKら (1988) は、ペレニアルライグラスでハードニングの終わりには LT_{50} と可溶性糖含量には相関が認められなかったと報告している。STEPONKUSら (1968) はヘデラを使った実験で、低温順化中に糖含量と耐寒性はどちらも増加するものの、その変化の程度が常に一致しているわけではないことを示し、低温順化が糖質の蓄積や浸透圧の変化単独によるものではないことを報告している。また、蓄積する糖質の種類についても単糖類や二糖類が多いが、リードカナリーグラスでは単糖類や二糖類だけでなく三糖類やフルクタンなどの蓄積もみられる (TRONSMOら, 1993). さらに、単糖類や二糖類が増加せずフルクタンのみが蓄積するものも報告されており (POLLOCKら, 1988), 様々な可溶性糖質との関係がみられる (GUSTAら, 1996). このように、植物の耐凍性機構における糖の生理的役割については多様であることが示されている。

野菜生産という点からみると、最近の消費者ニーズではより高品質な野菜が求められる傾向が顕著となっている。品質には外観や内容成分、流通・加工特性などいろいろな要素があるが、トマトなどの果菜類においては特に糖度が重視されている。キャベツを含む葉菜類においてもこの傾向があらわれており、野菜の高品質・高糖度化栽培技術の開発が必要とされている。そのため、品質成分のひとつである糖質についての知見、特に糖質蓄積に関する研究が求められている。本章では、第II章での低温順化・脱順化時の耐凍性の変化を踏まえて、キャベツにおける糖質の挙動と耐凍性との関係について様々な条件で検討し、耐凍性機構における糖質の関与を明らかにするとともに、キャベツにおける糖蓄積に関する知見を得ようとした。

2 材料および方法

a 実験 1. 低温順化・脱順化時の糖質の変化

キャベツ品種 '晩抽理想' を培養土を詰めたプラスチックポットに播種し、 $20/15^{\circ}\text{C}$ (昼/夜)、12時間日長のグロースチャンパー内で生育させた。メタルハイドラ

ンプを光源とし、光強度は約 $300\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ とした。播種 3 週間後に、 5°C のグロースチャンパーで 10 日間低温順化処理し、第 1 葉と第 2 葉を試料として糖を分析した。

低温順化中には緩やかながらも生育が進むことから、低温順化時における糖質濃度の変化が、生長によるものではなく、温度によるものであることを確認する必要がある。7 日間の低温順化処理終了時の生育ステージに合わせるため、低温処理開始前の幼植物を $20/15^{\circ}\text{C}$ でさらに 3 日間生育させたものと比較した。 $20/15^{\circ}\text{C}$ (昼/夜) の温度処理、 5°C の低温順化処理は上記と同様に行い、第 1 葉と第 2 葉を分けて糖を分析した。

さらに脱順化処理の影響について検討した。7 日間低温順化した幼植物を $20/15^{\circ}\text{C}$ のグロースチャンパーに戻して脱順化処理を行い、低温順化前、7 日間低温順化時、脱順化 3 日目までの第 2 葉で糖を分析した。

b 実験 2. 灌水制限による水ストレスが糖濃度に及ぼす影響

実験 1 と同様に生育させたキャベツ幼植物を供試した。播種後 3 週間生育させた幼植物を 12 時間日長、 $20/15^{\circ}\text{C}$ の温度条件下で 3 日間毎日灌水した対照区と灌水しなかった区を設けた。対照区には 1 日当たり 1 個体約 40ml 灌水した。それぞれの区で第 2 葉の糖濃度を測定した。

c 実験 3. 低温順化・脱順化時の土壤水分制限が糖濃度に及ぼす影響

光条件以外は、実験 1 と同様に生育させたキャベツ幼植物を供試した。光条件は 12 時間日長、光強度 $230\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ とした。低温順化開始時までは適宜灌水を行った。播種 3 週間後、第 2 葉展開時に幼植物を 7 日間 5°C のグロースチャンパーに移し、低温順化処理期間とした。試験区として低温順化処理期間中毎日灌水した区 (WA)、低温順化の最後 1 日だけ灌水した区 (RA)、無灌水区 (NA) を設け、低温順化前を対照区 (C) とした。低温順化処理終了時に各区の第 2 葉の糖を分析した。

脱順化処理は、7 日間 5°C で低温順化させた幼植物を 1 日間 20°C 暗条件下に移して行った。脱順化時の灌水処理区として、低温順化時から継続して灌水した区 (WDW)、低温順化時から灌水せずに脱順化中も無灌水の区 (NDN)、脱順化中だけ灌水した区 (NDW) を設けた。脱順化処理終了時に各脱順化処理区の第 2 葉の糖を分析した。1 日当たりの灌水量は 1 ポットあたり 40ml 以上とした。

d 実験 4. 短時間の脱順化処理が糖濃度に及ぼす影響

実験 1 と同様に生育させたキャベツ幼植物を供試した。

播種3週間後の幼植物を5°Cで10日間低温順化処理し、20°C暗条件下で6時間脱順化処理を行い、処理開始後0, 1, 3, 6時間後に耐凍性と第2葉の糖濃度を測定した。耐凍性の評価は第I章の電解質漏出程度を用いた。

e 糖質の分析

中肋を除いた葉身部から10倍量の80%熱エタノールで可溶性糖質を抽出した。室温まで冷却後、内部標準としてキシロースを加えて摩砕し、1500gで10分間遠心分離した。残さは5倍量の80%エタノールで再抽出を2回行い、得られた上清はまとめて遠心濃縮機で乾固させた。蒸留水1mlで乾固させた試料を溶解し、SEP-PAK C18 カートリッジ (Millipore Corporation, Massachusetts, USA) と0.45 μ m メッシュの親水性フィルターを通して精製した。この精製した試料を用いてHPLCで定量した。HPLCには示差屈折計を検出器とし、Shodex SUGAR SP0810 (Showa Denko, Tokyo, Japan) カラムを使い分析した。カラム温度を80°C、移動相は脱イオン水、流速0.8ml/minとした。

デンプンの測定は、可溶性糖類の抽出残さからのエタノール不溶性画分を凍結乾燥した試料を用いた。100mgの凍結乾燥試料に5mlのDMSOを加えて沸騰浴中で30分間加熱した。室温まで冷却後、攪拌したものを1500gで10分間遠心分離した。沈殿残さに5mlのDMSOを加えて再度懸濁、遠心分離した。両上澄みを合わせたものから0.02mlの試料溶液を分取しグルコアミラーゼ (*R. niveus*, Lyo., Seikagakukogyo Co., LTD. Tokyo, Japan) で消化させた。得られたグルコースは、グルコースBテストキット (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) を用いてグルコース酸化酵素法で定量し、デンプン濃度に換算した。

3 結果

a 実験1. 低温順化・脱順化時の糖質の変化

キャベツ葉の糖濃度は低温順化により顕著に増加した。低温順化処理3日間でスクロース、グルコース、フルクトース濃度は、それぞれ低温順化処理開始前の約2, 6, 3倍となった(図-17)。処理7日目から10日目にかけてスクロース濃度はやや減少したが、グルコースとフルクトース濃度は処理3日目から10日目にかけて緩やかな増加あるいはほぼ一定の値を保った。他の糖質に関してはミオ-イノシトールが検出されたが、低温順化で増加することはなかった。

不溶性炭水化物であるデンプン濃度は低温順化処理3日目の時点で処理前の1.5倍となり可溶性糖質に比べて

緩やかな増加であったが、その後急激に増加し、処理7日目には処理前の約5倍に達し、7日目から10日目にかけては増加はみられなかった(図-17)。

表-7に生育ステージを合わせたキャベツ幼植物における葉の糖濃度の比較を示す。低温順化開始前の対照区、生育ステージを合わせるため20/15°Cでさらに3日間生育させた区、7日間の低温順化区のそれぞれでは、スクロースとフルクトース濃度は第1葉よりも第2葉の方が高かった。20/15°Cで3日間生育させた区では対照区に比べ、スクロース濃度は若干増加したが、グルコースとフルクトース濃度はむしろ減少した。低温順化区では第1葉と第2葉ともにスクロース、グルコース、フルクトースが顕著に増加し、20/15°C下で生育ステージを進めた区よりも明らかに多量の糖質の蓄積がみられた。

表-8にキャベツ葉の糖濃度に及ぼす脱順化の影響を示す。低温順化処理によってスクロース、グルコース、フルクトース濃度はそれぞれ6.54, 5.74, 6.07 mg/g FWと増加したが、1日の脱順化処理でそれぞれ2.09, 0.35, 0.53 mg/g FWと急激に低温順化前と同じレベルにまで減少した。デンプン濃度も同様に低温順化処理によって9.47 mg/g FWまで増加し、脱順化処理によ

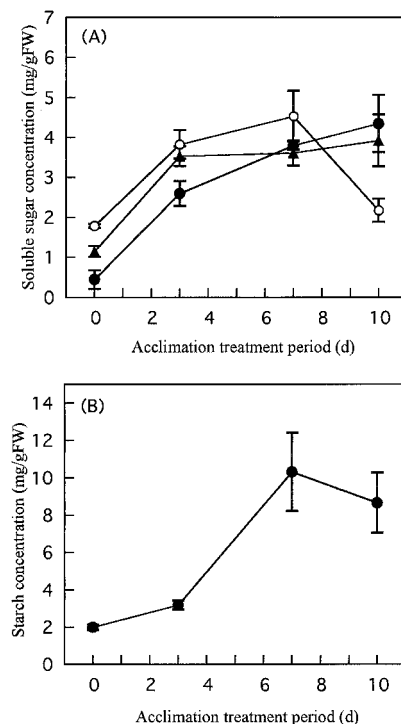


Fig.17 Soluble sugar (A) and starch (B) contents in cabbage leaves during exposure to low temperature (5°C). ○, sucrose; ●, glucose; ▲, fructose in (A). Vertical bars indicate standard errors (n=3).

て0.47 mg/g FWに減少した。このようにキャベツ幼植物の脱順化時には、耐凍性の消失と同様に蓄積した糖質も24時間以内に急速に減少することが明らかとなった。

b 実験2. 灌水制限による水ストレスが糖濃度に及ぼす影響

20/15°Cで生育させたキャベツ幼植物を灌水制限し、土壌含水率を低下させて水ストレスを与えた場合の葉の糖濃度について図-18に示す。その結果、同じ生育適温下で十分に灌水した対照区に比べて、葉のスクロース、グルコース、フルクトース濃度はそれぞれ約1.3, 3.7, 5.3倍に増加した。3日間灌水した対照区としなかった区の土壌含水率は、それぞれ45.4±1.6, 22.3±0.9%であった。

c 実験3. 低温順化・脱順化時の土壌水分制限が糖濃度に及ぼす影響

各処理区の土壌含水率は、対照区44.2±2.7%, WA区46.9±2.2%, WDW区51.2±0.7%, NA区21.4±1.5%, RA区47.1±0.9%, NDN区22.3±1.9%, NDW区47.3±0.7%であった。

低温順化・脱順化時の水ストレスがキャベツ葉の糖濃度に及ぼす影響を表-9に示す。無灌水で低温順化させた区(NA)は対照区に比べてスクロースで15倍、グルコースでは12倍、フルクトースで6.5倍の濃度まで増加した。灌水しながら低温順化した区(WA)に比べて

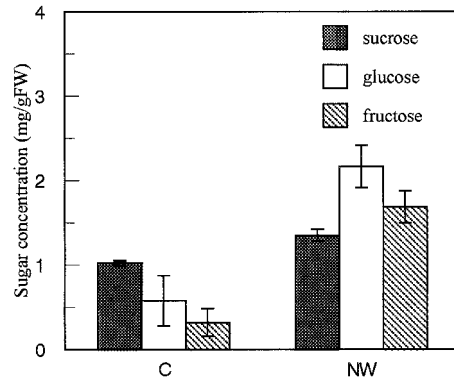


Fig.18 Sugar content in cabbage leaves affected by water stress. C, watered; NW, not watered. Vertical bars indicate standard errors (n=3).

Table 7 Soluble sugar contents in leaves of different positions at different growth stage.

Leaf position and growth stage	Concentration (mg/g fresh weight)		
	Sucrose	Glucose	Fructose
I-1 ^z	1.58±0.67 ^y	0.91±0.14	0.85±0.26
I-2	2.14±0.89	1.31±0.37	1.33±0.23
N-1	1.87±0.69	0.81±0.59	0.57±0.16
N-2	2.84±0.36	0.69±0.07	0.90±0.09
L-1	3.93±0.56	6.67±1.20	4.84±0.99
L-2	4.29±0.13	5.81±2.60	5.58±0.84

^z: I-1, 1st leaves at initial stage; I-2, 2nd leaves at initial stage; N-1, 1st leaves grown at normal temperature (20/15°C) for 3 days; N-2, 2nd leaves grown at normal temperature for 3 days; L-1, 1st leaves exposed to low temperature (5°C) for 7 days; L-2, 2nd leaves exposed to low temperature for 7 days.

^y: Values are means ± standard errors (3 replications).

Table 8 Soluble sugar and starch contents in cabbage leaves during cold acclimation by exposure to a low temperature (5°C) and deacclimation at a normal temperature (20/15°C).

Treatment	Concentration (mg/g fresh weight)			
	Sucrose	Glucose	Fructose	Starch
C ^z	1.39±0.25 ^y	0.51±0.10	0.75±0.23	0.77±0.15
7a	6.54±0.46	5.74±0.88	6.07±0.55	9.47±2.30
7a-1d	2.09±0.17	0.35±0.08	0.53±0.08	0.47±0.06
7a-2d	1.99±0.27	0.92±0.35	0.88±0.30	0.77±0.24

^z: C, control at normal temperature; 7a, 7 days cold acclimation; 7a-1d, 1 day deacclimation after 7 days cold acclimation; 7a-2d, 2 days deacclimation after 7 days cold acclimation.

^y: Values are means ± standard errors (3 replications).

も、水ストレスを与えた NA 区はスクロース、グルコース、フルクトース濃度の合計で約 1.2 倍と高かった。ただし、個々の糖について両区の間には LSD による有意差は認められなかった。このように、低温順化処理中も灌水制限による水ストレスは生重当たり糖質濃度を増加させる傾向があった。一方、低温順化処理中に灌水を再開した区 (RA) では、処理期間の最後 1 日のみの灌水だったにもかかわらず、処理終了時の糖濃度が、処理期間を通じて灌水した WA 区と同程度かそれ以下にまで減少した。特にスクロース濃度は NA 区の 0.47 倍、WA 区に比べても 0.56 倍に減少した。

脱順化処理については、脱順化処理期間中も灌水した WDW 区は低温順化処理によって増加した糖濃度が大きく減少した。WA 区に比べて、グルコース濃度は約 1/3、フルクトース濃度で約 1/2、スクロース濃度においては約 1/10 以下となった。低温順化中に灌水を制限し、脱順化時に灌水した NDW 区でもほぼ同程度の糖質の減少がみられた。一方、低温順化から脱順化まで灌水を制限して水ストレスを与えた NDN 区では、スクロースのみが約 1/4 に減少し、グルコースとフルクトースは脱順化処理前の濃度を維持した。

d 実験 4. 短時間の脱順化処理が糖濃度に及ぼす影響

10 日間の低温順化によって耐凍性が増加したキャベツ幼植物は、暗条件下で 20°C 処理すると 3 から 6 時間程度で耐凍性の減少が認められた (図-19)。この数時間単位の脱順化処理中においても糖濃度の変化がみられ、低温順化によって増加した糖濃度は 20°C の脱順化処理で減少した。グルコースとフルクトース濃度は脱順化処理中継続的に減少し、スクロース濃度は脱順化処理 1 時間後から減少がみられた。

4 考察

キャベツ幼植物は非凍結低温にさらされることである程度の耐凍性を獲得し、この変化には糖質の蓄積を伴うことが明らかとなった。20/15°C 下では生育ステージが多少進んだとしても低温下のように糖質が蓄積することはなく、5°C 処理による低温順化時に糖質が蓄積したのは、低温によるものであった。スクロース、グルコース、フルクトース合計の糖濃度は -6°C での凍結試験での耐凍性程度 (第二章、図-7) と正の相関関係 ($r=0.7$, $P<0.02$) がみられ、低温順化中の可溶性糖濃度が耐凍性に関わっていることが示唆された。低温順化したキャベツ葉の耐凍性と糖濃度は生育適温に戻す脱順化処理によって減少した。これらの結果は、いくつかの植物での報告と一致している (KAURIN ら, 1981; PERRAS ら, 1984; GUY ら, 1992)。糖質はおそらくキャベツ幼植物において耐凍性に関する重要な要因のひとつと思われる。KOSTER ら (1992) は、ライムギの可溶性糖質は低温順化中に増加するが、LT₅₀ が最低温度に達するより先に最高濃度になってしまうことを報告した。この結果や他の研究グループによる報告は、糖質以外の要因も耐凍性に影響を及ぼしていることを示唆している。

いくつかの植物では低温にさらされると可溶性糖質の濃度が増加するが、蓄積する糖質の種類は植物の種類によっても異なっている。ライムギではスクロースとフルクトース濃度が低温下で増加し (ANTIKAINEN ら, 1994)、低温にさらされたクラウドベリーではスクロース濃度が急激に増加し (KAURIN ら, 1981)、ホウレンソウではスクロース、グルコース、フルクトースが増加する (GUY ら, 1992) ことが報告されている。コムギ (TOGNETTI ら, 1989) と寒地型牧草 (POLLOCK ら, 1983) では低温によってフルクタン合成が引き起こされることが示唆されて

Table 9 Effects of water stress on soluble sugar contents in cabbage leaves. The treatments are the same as those in Table 4.

Treatment	Concentration (mg/g fresh weight)		
	Sucrose	Glucose	Fructose
C ^z	0.44±0.10 c ^y	0.89±0.10 d	2.53±1.42 e
WA	5.70±0.49 a	9.95±0.47 ab	12.79±0.55 bc
NA	6.69±0.64 a	10.91±0.57 a	16.57±1.65 ab
RA	3.17±0.25 b	9.56±0.15 b	13.81±0.73 ab
WDW	0.51±0.08 c	2.97±0.30 c	5.77±1.21 d
NDW	0.68±0.10 c	3.57±0.45 c	9.16±0.77 cd
NDN	1.70±0.15 bc	10.30±0.52 ab	16.87±0.45 a

z: Values are means ± standard errors (3 replications).

y: Means indicated by different letters within a column are significantly different (0.01 level) by LSD.

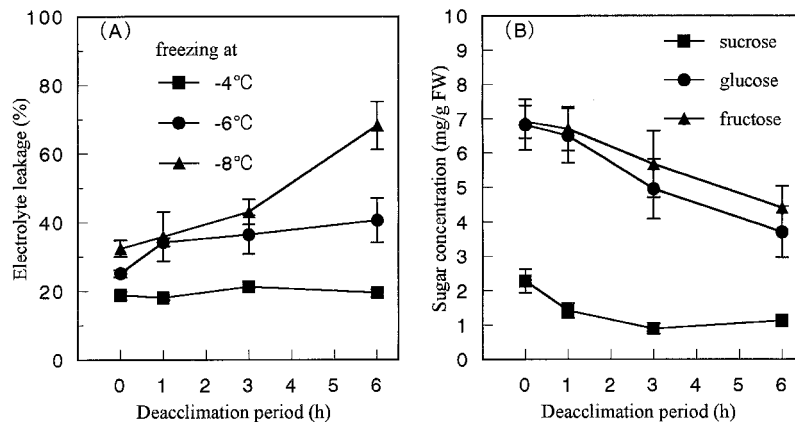


Fig.19 Effect of short-term deacclimation (20°C) on freezing tolerance (A) and soluble sugar contents (B) of cabbage leaves. Vertical bars indicate standard errors (A: n=4, B: n=6).

いる。本実験におけるキャベツ幼植物では、スクロース、グルコース、フルクトース濃度が低温下で増加した。しかし、植物の耐凍性の程度が低温下で蓄積する糖質の種類に依存するのかどうかは不明である。

糖質の持つ効果のひとつは、浸透ポテンシャルの低下を引き起こすことである (O'NEILL, 1983)。浸透ポテンシャルを下げるには二糖類よりも単糖類の方がより効果的であるが、上で述べたように単糖類以外の糖も蓄積される。糖質には、そのような浸透ポテンシャルを低下させるといふ、物質の種類に関係なくモル濃度に依存した効果以外に、凍結・脱水時に細胞中の生体膜やタンパク質が受ける傷害を緩和する働きを持つと考えられており (SAKAIら 1968; SANTARIUS, 1973; STEPONKUS, 1984)、さらに、結氷そのものを抑制する可能性も示唆されている (MACKENZIE, 1977)。

一般的に不溶性炭水化物であるデンプンは高等植物の主要な貯蔵炭水化物としての役割を担っている。実験1の結果、キャベツ幼植物では、それは低温順化中に増加し、脱順化中に減少した (表-8)。GUYら (1992) は、低温順化中のハウレンソウ葉でクロロプラストにデンプンが蓄積するが、その増加は耐凍性には関係していないことを示した。耐凍性におけるデンプンが持つ役割についてはさらなる研究が必要であろう。

低温によって引き起こされたキャベツ幼植物の耐凍性は、生育適温にわずか1日おくことで減少した (図-8)。脱順化に必要な時間は低温順化に要するよりもかなり短く、糖質の急激な減少を伴った。これらの結果はGUYら (1992) によるハウレンソウの報告と一致しており、低温下で葉に蓄積する糖質は常温下での脱順化で急速に

代謝されていることを示唆している。より短時間の脱順化においても、糖濃度が減少する傾向がうかがわれた。

キャベツ幼植物を灌水制限して水ストレスを与えた場合、葉のスクロース、グルコース、フルクトース濃度は灌水したものよりも増加した。これはワタやコムギで得られた結果と一致するものである。水ストレスを与えたワタでは、有機酸と炭水化物の含量が灌水したもの比べて2から5倍多くなった (TIMPAら, 1986)。水ストレスはいくつかの植物で糖類を蓄積させるが、この蓄積は植物組織の含水量が減少することによって溶質濃度が上昇しただけではなく、代謝の変化も関係している (TIMPAら, 1986; VYASら, 1985)。

実験3では、NDN区でのスクロースの減少程度は灌水しながら脱順化処理した場合よりも小さく、他の糖濃度はほとんど低下しなかったため、脱順化時の灌水制限による水ストレスは脱順化に伴う糖質の減少を抑制することが示唆された。これら低温順化・脱順化を通じて糖濃度の変化は、第II章の実験3における幼植物の耐凍性の変化と一致する傾向であった。このことは、可溶性糖質が耐凍性機構において重要な役割を果たしている可能性を支持するものである。

5 要約

キャベツ幼植物における低温順化・脱順化時の耐凍性の変化を踏まえて、糖質の増減と耐凍性との関係について様々な条件で検討し、耐凍性機構における糖質の関与を明らかにしようとした。

キャベツ幼植物に12時間日長下で5°Cの低温処理をすると、耐凍性が獲得されるとともにスクロース、グルコース、

フルクトースの蓄積が引き起こされ、低温順化期間が長くなるにしたがって濃度が増加した。キャベツ葉にはミオ-イノシトールもわずかながら含まれていたが、温度処理による影響は認められなかった。スクロース、グルコース、フルクトース濃度は -6°C での凍結試験における耐凍性の程度と正の相関関係 ($r=0.7$, $P<0.02$) がみられ、低温順化中の可溶性糖濃度が耐凍性に関わっていることが示唆された。なお、 $20/15^{\circ}\text{C}$ 下で生育させ、低温順化处理終了時と同程度の生育ステージに達した株では糖質の蓄積は認められず、低温によって蓄積が引き起こされていることが明らかとなった。一方、 5°C の低温順化处理によって蓄積したスクロース、グルコース、フルクトース濃度は、生育適温に戻す脱順化处理によって急速に減少した。デンプン濃度も同様に低温順化处理で増加し、脱順化处理で減少がみられた。

生育適温下での灌水制限によって水ストレスを与えた場合にも、キャベツ幼植物の葉においてスクロース、グルコース、フルクトース濃度が増加した。

低温順化・脱順化時に灌水制限によってキャベツ幼植物に水ストレスを与えるとスクロース、グルコース、フルクトース濃度への影響がみられた。 5°C の低温順化处理時に、灌水制限による水ストレスを与えると、灌水した場合に比べて可溶性糖質の蓄積が促進された。一方、低温順化处理中に灌水を再開すると、処理期間を通じて灌水した場合と同程度の濃度にまで急激に減少した。灌水制限したままで脱順化处理した場合は、脱順化处理時に灌水したものに比べて可溶性糖濃度が高いままであった。脱順化处理時の水ストレスは蓄積した糖質の減少を抑制した。これらのことから、キャベツの糖濃度を増加させる、あるいは脱順化時の糖濃度の減少を抑えるためには、遭遇する温度を非凍結低温から生育適温へと上昇させないとともに水ストレスを与えることによっても効果のあることが示唆された。

V 低温順化・脱順化時におけるスクロース代謝の解析

1 緒言

これまでに、キャベツ幼植物の耐凍性機構には糖質が関与していることを示してきた。他の植物でも糖代謝が温度ストレスの影響を受けること (PERRASら, 1984)、低温ストレスに対する反応として糖が蓄積すること (KAURINら, 1981) が知られている。低温に対する反応に比較的共通して蓄積するのはスクロースと考えられて

いる (GUYら, 1992)。コムギ (PERRASら, 1984) やホウレンソウ (GUYら, 1992)、キイチゴ (KAURINら, 1981) などでは、糖含量の変化と耐凍性とに相関がみられており、キイチゴでは特にスクロース含量と LT_{50} の間に高い相関が得られている。FOWLERら (1981) は冬コムギの品種間で耐凍性の違いを調べ、耐凍性と冠部のスクロース濃度との間に 0.88 の相関係数が得られたことを報告している。このようにスクロースは、可溶性糖質の中でも耐凍性への関与が高いとみられている。

スクロース代謝については、スクロースを不可逆的にグルコースとフルクトースに加水分解するインベルターゼ (E. C. 3. 2. 1. 26)、UDP-グルコースとフルクトース-6-リン酸からスクロース-6-リン酸を生ずるスクロース-リン酸合成酵素 (E. C. 2. 4. 1. 14)、および UDP-グルコースとフルクトースが結合してスクロースを生じる可逆的の反応を触媒するスクロース合成酵素 (E. C. 2. 4. 1. 13) が直接的にスクロース合成や分解に関わっているものと考えられる。シンク器官である果実の例であるが、YELLEら (1991) は、スクロースを主に蓄積する非栽培種のトマトとグルコースやフルクトースを中心に蓄積する栽培種のトマトとでスクロース合成酵素活性や酸性インベルターゼ活性と糖蓄積との関係を比較し、果実のスクロース蓄積は酸性インベルターゼの制御によるものとしている。また、メロンの場合にはスクロースを多く蓄積する品種とそうでない品種との比較により、スクロース-リン酸合成酵素の活性の高いものがスクロースの蓄積が多いことが報告されている (HUBBARDら, 1989)。ホウレンソウ (GUYら 1992) やコムギ (CALDERONら, 1985; TOGNETTIら, 1989) では低温下でのスクロース代謝関連酵素活性の変化が研究されているが、酵素活性の変化は植物種によって異なるとされている。低温順化に伴うスクロースの蓄積や脱順化に伴う減少を引き起こすメカニズムについては解明されておらず、低温順化中のキャベツの糖代謝に関わる酵素についての情報も少ない。そこで本章では、耐凍性に関係する糖代謝を解明するためにキャベツ幼植物の低温順化・脱順化時におけるスクロース合成酵素、スクロース-リン酸合成酵素、インベルターゼ活性の変化について検討した。

2 材料および方法

キャベツ品種 '晩抽理想' を播種後 3 週間、 $20/15^{\circ}\text{C}$ (昼/夜) のグロースチャンパーで育てた。光源にはメタルハライドランプを用いて、光強度約 $230 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、12 時間日長とした。播種後 22 日目の第 2 葉展開時から

幼植物を 5°C、12 時間日長条件で 10 日間低温順化処理した。10 日間の低温順化処理後に再び 20/15°C、12 時間日長条件に 5 日間戻し、脱順化処理とした。低温順化前を対照として、低温順化処理時および脱順化処理時に供試株の第 2 葉を液体窒素下で凍結し酵素抽出サンプルとした。全ての手順は特別の断りがない限り 4°C 以下で行った。糖質の分析は、液体窒素で凍結し -80°C で保存した葉片から 80% 熱エタノールで抽出し、第 IV 章で述べた方法に従った。

a スクロース合成酵素とスクロース-リン酸合成酵素の抽出

凍結させた葉片は、5mmol/l β -メルカプトエタノール、2mmol/l EDTA、2% (w/v) ポリビニルピロリドンを含む 50mmol/l HEPES-KOH 緩衝液 (pH 8.0) 中で摩砕した。摩砕した試料を 15000g で 10 分間遠心分離し、6mmol/l β -メルカプトエタノールと 2mmol/l EDTA を含む 20mmol/l HEPES-KOH 緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した NAP-10 カラム (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を通して脱塩した。

b 可溶性インペルターゼと細胞壁結合型インペルターゼの調製

凍結させた葉片を 0.1% (w/v) アスコルビン酸と 10mmol/l β -メルカプトエタノールを含む 50mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.8) 中で摩砕後、10000g で 10 分間遠心分離した。残さは同様の緩衝液で懸濁して、再度遠心分離した。この操作を 3 回繰り返して、それぞれで得られた上清をあわせたものを直ちに 0.1% (w/v) アスコルビン酸と 10mmol/l β -メルカプトエタノールを含む 50mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.8) で平衡化した NAP-10 カラムを通して脱塩し、可溶性インペルターゼ活性の測定に用いた。細胞壁結合型インペルターゼは、得られた残さを洗い、10mmol/l β -メルカプトエタノールを含む 10mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.8) に対して一晩透析し、測定に用いた。

c 酵素活性の測定

スクロース分解方向のスクロース合成酵素活性は、M ORELL ら (1985) の方法を一部改良して、生成した UDP-グルコース量を酵素カップリング法で測定した。30mmol/l MES-KOH 緩衝液 (pH 6.5)、200mmol/l スクロースと 2mmol/l UDP に酵素試料を加えて反応液とした。30°C で 45 分間酵素反応させた後、1/5 倍量の 300mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加えて沸

騰水中に 3 分間入れて反応を停止させた。UDP-グルコースの生成量は、2.3mmol/l β -NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) と 2.3mmol/l EDTA を含む 0.37mol/l グリシン-KOH 緩衝液 (pH 8.7) を反応液に加え、0.085U/ml UDP グルコース脱水素酵素を反応させる前後での 340nm の吸光度の増加を自記分光光度計で測定した。

スクロース合成方向は MORIGUCHI ら (1988) の方法に従って測定した。15mmol/l フルクトース、2mmol/l UDP-グルコース、5mmol/l 塩化マグネシウムを含む 15mmol/l HEPES-KOH 緩衝液 (pH 8.5) に酵素試料を加えて反応液とし、30°C で 45 分間反応させた後、1/5 倍量の 300mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加え 3 分間煮沸した。生成したスクロースはレゾルシノール法 (ROE, 1934) で測定した。

スクロース-リン酸合成酵素活性はスクロース合成方向のスクロース合成酵素活性の測定法において、pH 8.5 の HEPES-KOH 緩衝液を pH 6.5 の MES-KOH 緩衝液に変更し、15mmol/l フルクトースの代わりに 15mmol/l フルクトース-6-リン酸を用い、さらに 1.3mmol/l フッ化ナトリウムを加える以外は同様に測定した。

インペルターゼ活性は、LEE ら (1997) の方法に一部変更を加えて酸性インペルターゼ活性を測定した。100mmol/l スクロースを含む 60mmol/l 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に酵素試料を加えて 30°C で 45 分間反応させた。1/5 倍量の 300mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加えて煮沸し反応を停止させた。生成したグルコースは、グルコース B テストキット (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) を用いてグルコース酸化酵素法で測定した。

3 結果

a 低温順化・脱順化時の糖濃度の変化

キャベツ幼植物を 5°C で低温順化処理すると、処理 3 日目にはスクロース、グルコース、フルクトースの蓄積がみられ、低温順化前に比べ 3 から 4 倍の濃度まで増加した。その後、7 日目まで増加し、7 日目から 10 日目にかけては大きな変化がなかった (図-20)。10 日間の低温順化処理の後、脱順化処理を開始したところ、糖濃度は 3 日間で減少し、脱順化処理 5 日目には低温順化開始前のレベルまで減少した。しかし、脱順化処理を行わず、低温順化処理を 15 日目まで延長させた場合には、糖濃度が低温順化前のレベルに戻ることはなかった。なお、キャベツ葉ではミオ-イノシトールも検出されたが、そ

の濃度は低温順化・脱順化を通じて変化が小さかった。

b 低温順化・脱順化時のスクロース合成酵素活性の変化

スクロース合成酵素活性の pH 依存性を図-21A, B に示す。スクロース分解方向の至適活性は pH 6.5, スクロース合成方向の至適活性は, pH 8.5 と 9.0 の間であった。これらの至適 pH は他の植物での報告と一致するものであった (MORELLら, 1985; MORIGUCHIら,

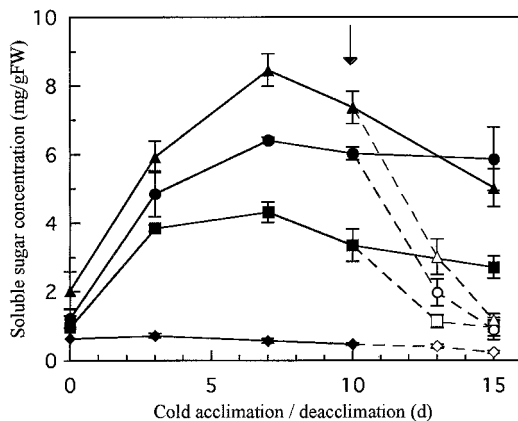


Fig.20 Soluble sugar contents of cabbage leaves during cold acclimation (5 °C) and deacclimation (20/15°C). Sucrose (■—■), glucose (●—●), fructose (▲—▲) and inositol (◆—◆) during cold acclimation; sucrose (□--□), glucose (○--○), fructose (△--△), and inositol (◇--◇) transferred to deacclimation after 10 days cold acclimation (↓). Vertical bars indicate standard errors (n=3).

1988). しかし, 本実験で同じ pH でも異なる緩衝液で活性に違いがみられた理由については不明である。

スクロース合成酵素活性の低温順化・脱順化処理に伴う変化はスクロース分解方向と合成方向の両方向について同様であった (図-22). スクロース合成酵素活性は低温順化処理中に増加し, 処理 10 日目には処理前の約 3 倍のレベルに達した。10 日間の低温順化処理後に脱順化処理を行うと活性が減少し, 脱順化処理 5 日目には低温順化処理開始前とほぼ同じレベルまで減少した。しかし, 脱順化処理を行わず, 低温順化処理を 15 日目まで続けた場合には, 活性は 10 日目と同等かあるいはわずかに増加し, 脱順化処理した場合のように減少はしなかった。以上のように, スクロース合成酵素活性は, 低温順化・脱順化に対応して増加・減少した。

c 低温順化・脱順化時のスクロース-リン酸合成酵素活性の変化

スクロース-リン酸合成酵素の至適 pH 領域は 6.0 から 6.5 の間であった (図-23)。これは, DOEHLERTら (1983) の報告よりも酸性側であった。スクロース-リン酸合成酵素活性も低温順化処理中に増加し, 10 日間の低温順化処理で処理開始前の 2 倍のレベルに達した (図-24)。10 日間の低温順化処理の後に脱順化処理した場合には, 脱順化処理 3 日目までは増加し続けたが, その後低温順化処理開始前のレベルまで急激に減少した。脱順化処理を行わず低温順化処理を 15 日目まで継続した場合には, スクロース-リン酸合成酵素活性は 10 日目とほぼ同じレベルに維持された。

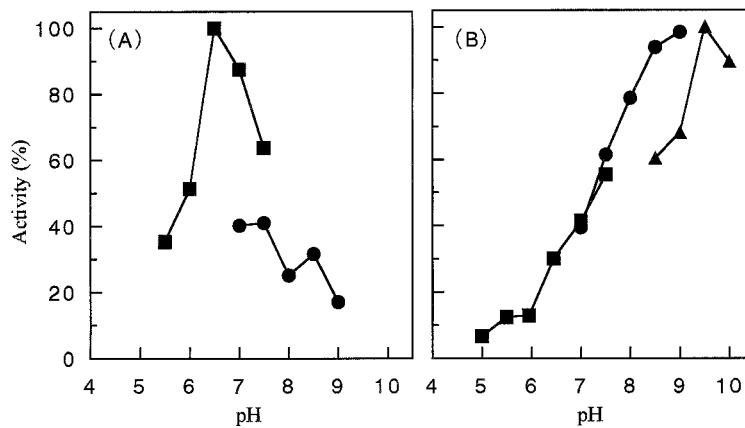


Fig.21 Effect of pH on sucrose synthase activity, (A) sucrose cleavage direction; (B) sucrose synthesis direction. Symbols (■), (●) and (▲) indicate buffers MES-KOH, HEPES-KOH and glycine-NaOH, respectively. The degree of activity was expressed as a percentage of highest activity.

d 低温順化・脱順化時の酸性インペルターゼ活性の変化

酸性インペルターゼ活性の大部分 (98.3%) は可溶性画分にみとめられ、細胞壁ではほんのわずかであった (図-25)。また、粗酵素液でのインペルターゼの至適 pH は 5.0 であり、アルカリ領域の活性はごくわずかであった (データ省略)。これらの結果から、キャベツ葉のインペルターゼ活性のほとんどが他の植物における成葉 (HUBER, 1989; SCHOLLESら, 1996) と同じく、可溶性の酸性インペルターゼであることが明らかとなった。そのため、以降の実験では可溶性の酸性インペルターゼ

活性のみを測定した。

酸性インペルターゼ活性は、低温順化処理開始後に緩やかに減少し、処理 10 日目には処理開始前の約 50% のレベルまで達した (図-26)。低温順化処理を 10 日以降も継続すると、15 日目まで活性は緩やかに減少した。しかし、低温順化処理を 10 日目まで行い、その後脱順化処理すると脱順化処理 3 日目に一時的に増加し、その後は再び減少し、脱順化処理 5 日目には低温順化処理を継続した場合とほぼ同じレベルとなった。

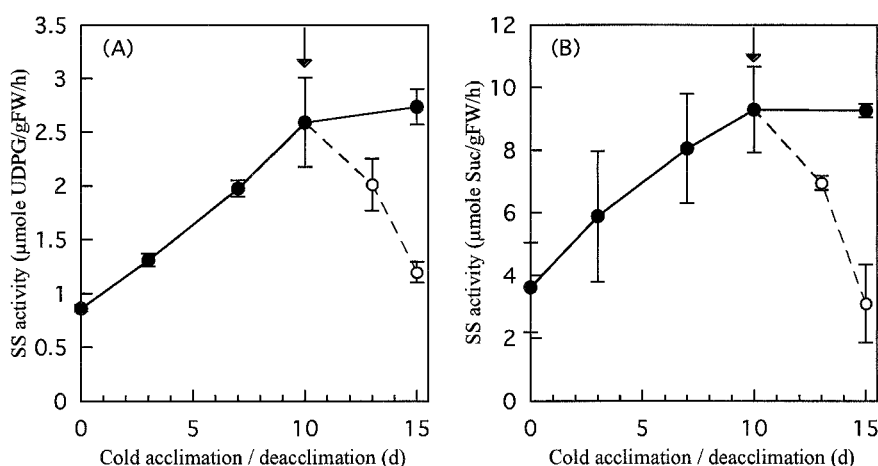


Fig.22 Changes in sucrose synthase activity of cabbage leaves during cold acclimation (5°C) and deacclimation (20/15°C). (A) : sucrose cleavage direction; (B) : sucrose synthesis direction. ●—● cold-acclimated; ○--○ deacclimated after 10 days cold acclimation (↓). Vertical bars indicate standard errors (n=3).

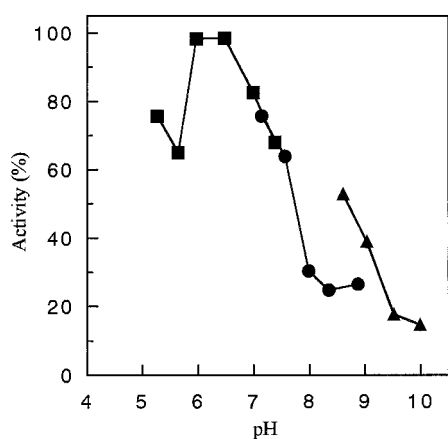


Fig.23 Effect of pH on sucrose phosphate synthase activity. Symbols (■), (●) and (▲) indicate buffers MES-KOH, HEPES-KOH and glycine-NaOH, respectively. The degree of activity was expressed as a percentage of highest activity.

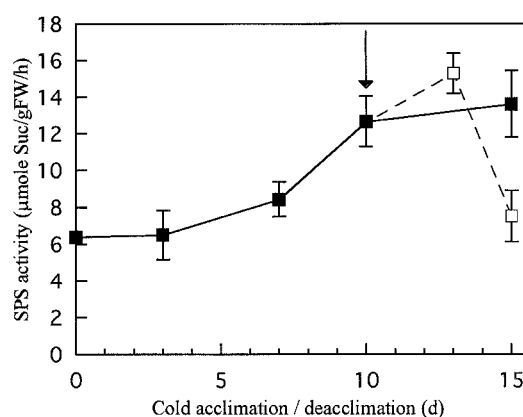


Fig.24 Changes in sucrose phosphate synthase activity of cabbage leaves during cold acclimation (5°C) and deacclimation (20/15°C). ■—■ cold acclimated; □--□ deacclimated after 10 days cold acclimation (↓). Vertical bars indicate standard errors (n=3).

4 考察

キャベツの葉のスクロース合成酵素活性は、スクロース分解・合成両方向ともに低温順化中に増加したが、植物を生育適温に戻すことによって低温順化前の活性レベルまで減少した。このことは、スクロース合成酵素活性の増加は低温処理時の生長に伴うものではなくて、低温順化の一環として引き起こされたことを意味している。コムギのスクロース合成酵素活性は低温順化によって増加することが報告されている (CALDERÓNら, 1985; TOGNETTIら, 1989)。しかし、ハウレンソウ (GUYら, 1992) や藻類 (SALERNOら, 1989) のスクロース合成酵素活性は低温による影響を受けず、アルファルファ

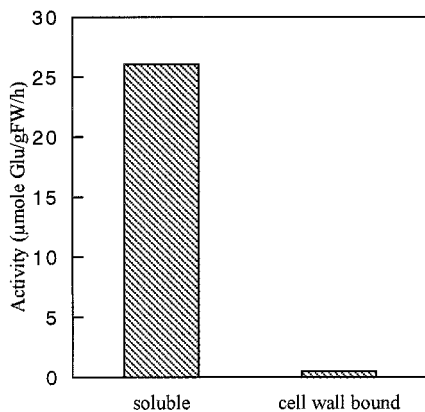


Fig.25 Activity of acid invertase in soluble and cell wall bound fractions prepared from leaves of cabbage seedlings.

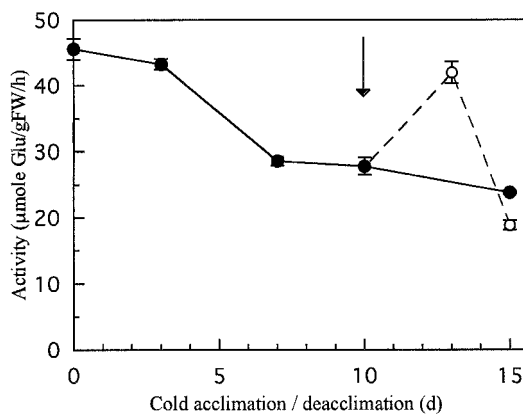


Fig.26 Changes in soluble acid invertase activity of cabbage leaves during cold acclimation (5°C) and deacclimation (20/15°C). ●—● cold-acclimated; ○--○ deacclimated after 10 days cold acclimation (↓). Vertical bars indicate standard errors (n=3).

(CASTONGUAYら, 1998) では秋からの季節変化で活性が減少することが報告されている。さらには、コムギで低温 (6°C) に反応してSS1遺伝子の mRNA レベルが増加する一方、SS2の mRNA レベルは有意には影響を受けなかった (MARAÑAら, 1990)。このように、低温処理によるスクロース合成酵素活性の変化は材料とした植物間で異なっている。

一般に、生体内でのスクロース合成酵素はスクロース合成よりむしろ分解の役割を果たしている (MORELLら, 1985)。これはスクロースの分解によって、UDP-グルコースや ADP-グルコースをデンプンや細胞壁の多糖類の合成のために供給していると思われる。本実験で低温処理したキャベツ幼植物ではデンプンも蓄積した。さらには、低温順化中にヘキソースも蓄積した。これらのことは、低温順化によって変化するキャベツの葉のスクロース合成酵素活性は、UDP-グルコースや ADP-グルコースの供給を通じて耐凍性の獲得を伴った生理学的変化に寄与していることを示唆している。しかし、スクロース合成酵素のアイソザイムが存在し、スクロース分解よりむしろ合成方向の基質に高い親和性を持ち、モモやニホンナシ果実のスクロース蓄積に重要な役割を果たしていることが最近報告されている (MORIGUCHIら, 1990; SUZUKIら, 1996)。したがって、キャベツのスクロース合成酵素が主にスクロース合成に関わっている可能性を完全に否定することは出来ない。スクロースの蓄積とスクロース合成酵素活性の増加の関係を議論するためには、基質親和性を明らかにする必要がある。

スクロース-リン酸合成酵素はスクロース合成に働き (HUBERら, 1996)、イチゴ (HUBBARDら, 1991) やトマト (YELLEら, 1991) 等におけるスクロース蓄積のキー酵素とされる。本実験ではスクロース-リン酸合成酵素の活性は低温順化中に増加したが、生育適温に戻されると低温順化前のレベルまで減少した。このことは、スクロース-リン酸合成酵素活性も低温順化処理によって調節を受けていることを示している。この結果は、藻類 (SALERNOら, 1989)、ハウレンソウ (GUYら, 1992)、コムギ (TOGNETTIら, 1989) での報告と一致している。本実験での低温順化処理によって引き起こされたスクロースの蓄積は、スクロース-リン酸合成酵素活性の増加によるものと思われる。

キャベツの葉におけるインベルターゼ活性の大部分は酸性の可溶性画分であり、この可溶性酸性インベルターゼ活性は低温順化中に減少がみられた。しかし、酸性インベルターゼ活性は生育適温に植物を戻すと初め一時的に増加す

るものの、その後は減少し低温順化前のレベルに戻らなかったため、酸性インベルターゼ活性の減少は低温順化によるものではないと考えられる。HUBER (1989) は、酸性インベルターゼ活性は、ダイズとハウレンソウの葉が展開するに従って減少することを報告している。

第IV, V章の結果から、キャベツの低温順化・脱順化を含む耐凍性機構の一端として、耐凍性と糖質との関係の解明が進んだ。こうした糖代謝を調節することや脱順化を防止することができれば、キャベツの耐凍性を誘導・維持して、凍霜害を軽減することが可能になり、また、糖質の蓄積についての知見は葉菜類での高糖度化栽培技術の開発に寄与する可能性があるものと思われる。

5 要約

第IV章においてキャベツ幼植物の耐凍性にはスクロース、グルコース、フルクトースの蓄積が関与していることが示された。しかし、これらの糖のうちスクロース代謝に直接的に関与しているインベルターゼ、スクロース-リン酸合成酵素、スクロース合成酵素活性と低温順化によるスクロースの蓄積との関係、脱順化による減少との関係については明らかではない。そこでキャベツ幼植物の耐凍性に関係する糖代謝を解明する一環として、低温順化・脱順化時におけるそれらの酵素活性の変化について検討した。

キャベツ幼植物は非凍結低温にさらされると耐凍性を獲得し、生育適温に戻されると耐凍性を失うが、ミオイノシトールを除く可溶性糖質は5°Cの低温順化処理によって蓄積し、10日間の低温順化から5日間脱順化処理することで、スクロース、グルコース、フルクトース濃度が低温順化前のレベルまで急激に減少した(第IV章)。

スクロース合成酵素の活性は低温順化時に増加がみられ、10日間の低温順化では低温順化前の活性の3倍まで増加した。その後の脱順化時には活性の減少がみられ、5日間の脱順化で低温順化前のレベルまで減少した。スクロース-リン酸合成酵素の活性も低温順化中に増加がみられ、10日間の低温順化では低温順化前の2倍まで増加したが、脱順化によって減少し、5日間の脱順化時には低温順化前のレベルとなった。スクロース合成酵素とスクロース-リン酸合成酵素の活性は、低温順化処理を継続した場合、10日目から15日目まで減少することがなく、低温順化処理・脱順化処理に同調して増加・減少した。

酸性インベルターゼ活性は大部分が可溶性画分にみられた。可溶性の酸性インベルターゼ活性は低温順化中に

緩やかに減少し、10日間で低温順化前の約50%となった。しかし、脱順化時には活性の一時的な増加はみられたが、その後再び減少し低温順化前のレベルまで回復することはなかった。

以上の結果より、キャベツ幼植物の葉におけるスクロース代謝に関しては、酸性インベルターゼを除くスクロース合成酵素とスクロース-リン酸合成酵素は、低温順化・脱順化によって調節を受けていることが明らかとなった。そして、これらの酵素活性の調節を含む糖代謝が低温順化・脱順化という過程を通じて、キャベツ幼植物の葉における糖の蓄積と耐凍性の獲得に重要な役割を持つことが示唆された。

総合摘要

キャベツは日本において重要な野菜のひとつであるが、その生産は年間を通じて安定しているわけではなく、特に冬場を中心として安定生産が課題となっている。低温期の安定生産には、凍霜害の軽減技術を開発するために耐凍性機構を解明する必要がある。キャベツの幼植物において、低温順化・脱順化という現象を通じて耐凍性機構について明らかにし、耐凍性機構に関与する糖代謝について検討を行った。

キャベツ幼植物は5°Cの低温処理によっても緩やかながら生長を続け、処理3日目から耐凍性が獲得され始め、低温処理期間の経過とともに耐凍性は増加した。これは生育ステージが進むことによるものではなく、非凍結低温によって低温順化したことによるものであった。生育適温での水ストレスはキャベツ幼植物において耐凍性を増加させる傾向がうかがわれたが、低温順化による耐凍性の増加に比較するとわずかであった。7日間5°C処理により獲得された耐凍性は、1日間生育適温に戻すことで速やかに消失した。低温順化には非凍結低温とともに光も必要であったが、脱順化では必ずしも光を必要としないことが明らかとなった。低温順化・脱順化時の水ストレスは耐凍性に影響を与え、低温順化時も灌水制限による水ストレスが耐凍性の増加を促進した。脱順化時の水ストレスは耐凍性の減少を抑制した。脱順化による耐凍性の減少は低温順化に比べて速やかに引き起こされ、3~6時間の脱順化処理によっても耐凍性は減少し、また、脱順化の程度は処理温度に依存していた。こうした速やかな脱順化は、結球時のキャベツでもみられた。冬期間の圃場でも晴天時に結球部表面付近の葉への直達光が葉温を上昇させて、結球部表面付近の葉で脱順化を引

き起こしている可能性が明らかとなり、一時的な遮光によって日中の葉温上昇を防ぎ脱順化を軽減できることが示唆された。

5°Cの低温処理によりキャベツ幼植物の耐凍性が増加し、それに伴ってスクロース、グルコース、フルクトースが葉に蓄積した。葉の糖濃度は-6°Cでの凍結試験での耐凍性と正の相関関係がみられ、低温順化中の可溶性糖濃度が耐凍性に関わっていることが示唆された。デンプン濃度も-6°Cでの凍結試験による耐凍性と正の相関関係がみられた。一方、低温順化によって蓄積したスクロース、グルコース、フルクトースは脱順化により急速に減少した。これも耐凍性と一致した変化であった。デンプン濃度も同様に低温順化で増加し脱順化で減少した。低温順化・脱順化時の水ストレスは糖濃度にも影響を与え、低温順化時も灌水制限による水ストレスが糖質の蓄積を促進した。脱順化時の水ストレスは糖濃度の減少を抑制した。脱順化による糖質の減少は、低温順化に比べて速やかに引き起こされた。スクロースの蓄積がみられる低温順化時のスクロース合成酵素活性は低温順化前の活性の3倍まで増加したが、脱順化時には低温順化前のレベルまで減少した。スクロース-リン酸合成酵素の活性も低温順化中に増加し、脱順化時には低温順化前のレベルまで減少した。しかし、酸性インベルターゼ活性は、低温順化中に緩やかに減少したが、脱順化時には低温順化前のレベルまで増加しなかった。これらの結果は、酸性インベルターゼを除いて、スクロース合成酵素とスクロース-リン酸合成酵素は低温順化・脱順化によって調節を受けており、キャベツ幼植物の葉における糖の蓄積と耐凍性の獲得に重要な役割を持つことが示唆された。

引用文献

- 1) ALBERDI, M. and L. J. CORCUERA. 1991. Cold acclimation in plants. *Phytochemistry* **30**: 3177-3184.
- 2) ANTIKAINEN, M. and S. PIHAKASKI. 1994. Early developments in RNA, protein, and sugar levels during cold stress in winter rye (*Secale cereale*) leaves. *Ann. Bot.* **74**: 335-341.
- 3) 芦澤正和. 1973. キャベツ. pp. 660-681. 秋谷良三編著. 蔬菜園芸ハンドブック. 養賢堂. 東京.
- 4) 芦澤正和. 1985. キャベツ. pp. 1159-1182. 清水茂監修. 訂正追補 野菜園芸大事典. 養賢堂. 東京.
- 5) 芦澤正和. 1995. 品種の育成と病害抵抗性. pp. 41. 高野泰吉. 園芸の世紀2 野菜をつくる. 八坂書房. 東京.
- 6) BURKE, M. J., L. V. GUSTA, H. A. QUAMME, C. J. WEISER and P. H. LI. 1976. Freezing and injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **27**: 507-528.
- 7) BURROWS, R. L., L. JR. WATERS and A. H. MARKHART III. 1989. Cold acclimation of asparagus seedlings subjected to low temperatures or water stress. *HortScience* **24**: 812-814.
- 8) CALDERÓN, P. and H. G. PONTIS. 1985. Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock. *Plant Sci.* **42**: 173-176.
- 9) CASTONGUAY, Y. and P. NADEAU. 1998. Enzymatic control of soluble carbohydrate accumulation in cold-acclimated crowns of alfalfa. *Crop Sci.* **38**: 1183-1189.
- 10) CLOUTIER, Y. and C. J. ANDREWS. 1984. Efficiency of cold hardiness induction by desiccation stress in four winter cereals. *Plant Physiol.* **76**: 595-598.
- 11) CLOUTIER, Y. and D. SIMINOVITCH. 1982. Correlation between cold- and drought- induced frost hardiness in winter wheat and rye varieties. *Plant Physiol.* **69**: 256-258.
- 12) COX, W. and J. LEVITT. 1969. Direct relation between growth and frost hardening in cabbage leaves. *Plant Physiol.* **44**: 923-928.
- 13) COX, W. and J. LEVITT. 1976. Interrelations between environmental factors and freezing resistance of cabbage leaves. *Plant Physiol.* **57**: 553-555.
- 14) DOEHLERT, D. C. and S. C. HUBER. 1983. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. *Plant Physiol.* **73**: 989-994.
- 15) FENNEL, A., P. H. LI and A. H. MARKHART III. 1990. Influence of air and soil temperature on water relations and freezing tolerance of spinach (*Spinacia oleracea*). *Physiol. Plant.* **78**: 51-56.
- 16) FLORE, J. A., G. S. HOWELL and C. E. SAMS. 1983. The effect of artificial shading on cold hardiness of peach and sour cherry. *HortScience* **18**: 321-322.
- 17) FOWLER, D. B., L. V. GUSTA and N. J. TYLER. 1981. Selection for winter hardiness in wheat and screening methods. *Crop Sci.* **21**: 896-901.
- 18) GEORGE, M. F., M. R. BECWAR and M. J. BURKE. 1982. Freezing avoidance by deep undercooling of tissue water in winter-hardy plants. *Cryobiology* **19**: 628-639.
- 19) GILMOUR, S. J., R. K. HAJELA and M. F. THOMASHOW. 1988. Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **87**: 745-750.
- 20) GRIFFITH, M. and H. C. H. MCINTYRE. 1993. The interrelationship of growth and frost tolerance in winter rye. *Physiol. Plant.* **87**: 335-344.
- 21) GUSTA, L. V., R. W. WILEN and P. FU. 1996. Low-temperature stress tolerance: The role of abscisic acid, sugars, and heat-stable proteins. *HortScience*. **31**: 39-46.
- 22) GUY, C. L. and D. HASKELL. 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.* **84**: 872-878.
- 23) GUY, C. L., J. L. A. HUBER and S. C. HUBER. 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol.* **100**: 502-508.
- 24) HUBBARD, N. L., S. C. HUBER and D. M. PHARR. 1989. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Physiol.* **91**: 1527-1534.
- 25) HUBBARD, N. L., D. M. PHARR and S. C. HUBER. 1991.

- Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiol. Plant.* **82**: 191-196.
- 26) HUBER, S. C. 1989. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. *Plant Physiol.* **91**: 656-662.
- 27) HUBER, S. C. and J. L. HUBER. 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **47**: 431-444.
- 28) 五十嵐大造・大林延夫. 1985. 夏まき冬どりキャベツの凍害と腐敗病の関係について. 神奈川園試研報. **32**: 35-41.
- 29) 五十嵐大造・岡田益己. 1989. キャベツの凍害防止を目的としたべたがけ下の気温および葉温と屋外風速の関係. 神奈川園試研報. **38**: 15-19.
- 30) JUNG, G. A. and D. SMITH. 1961. Trends of cold resistance and chemical changes over winter in the roots and crowns of alfalfa and medium red clover. I. Changes in certain nitrogen and carbohydrate fractions. *Agron. J.* **53**: 359-364.
- 31) KAURIN, Å., O. JUNTILA and J. HANSEN. 1981. Seasonal changes in frost hardiness in cloudberry (*Rubus chamaemorus*) in relation to carbohydrate content with special reference to sucrose. *Physiol. Plant.* **52**: 310-314.
- 32) KELLER, F. and M. M. LUDLOW. 1993. Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *J. Exp. Bot.* **44**: 1351-1359.
- 33) 吉川雅夫・星野和生・小林和彦・野口正樹. 1979. 野菜寒害発生頻度と被害の地域性. 野菜試栽培部年報. **6**: 25-29.
- 34) KISHITANI, S., K. WATANABE, S. YASUDA, K. ARAKAWA and T. TAKABE. 1994. Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant Cell Environ.* **17**: 89-95.
- 35) KOHN, H. and J. LEVITT. 1965. Frost hardiness studies on cabbage grown under controlled conditions. *Plant Physiol.* **40**: 476-480.
- 36) KOSTER, K. L. and D. V. LYNCH. 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma rye. *Plant Physiol.* **98**: 108-113.
- 37) LEE, T., A. SUGIYAMA, K. TAKENO, H. OHNO and S. YAMAKI. 1997. Changes in content of indole-3-acetic acid and in activities of sucrose-metabolizing enzymes during fruit growth in eggplant (*Solanum melongena* L.). *J. Plant Physiol.* **150**: 292-296.
- 38) LIMIN, A. E. and D. B. FOWLER. 1985. Cold-hardiness response of sequential winter wheat tissue segments to differing temperature regimes. *Crop Sci.* **25**: 838-843.
- 39) MACKENZIE, A. P. 1977. Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Ser. B.* **278**: 167-189.
- 40) MÄNTYLÄ, E., V. LÄNG and E. T. PALVA. 1995. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**: 141-148.
- 41) MARAÑA, C., F. GRACIA-OLMEDO and P. CARBONERO. 1990. Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene* **88**: 167-172.
- 42) MOHAPATRA, S. S., R. J. POOLE and R. S. DHINDSA. 1987. Changes in protein patterns and translatable messenger RNA populations during cold acclimation of alfalfa. *Plant Physiol.* **84**: 1172-1176.
- 43) MOHAPATRA, S. S., R. J. POOLE and R. S. DHINDSA. 1988. Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol.* **87**: 468-473.
- 44) MORELL, M. and L. COPELAND. 1985. Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* **78**: 149-154.
- 45) MORIGUCHI, T., T. SANADA and S. YAMAKI. 1990. Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **115**: 278-281.
- 46) MORIGUCHI, T. and S. YAMAKI. 1988. Purification and characterization of sucrose synthase from peach (*Prunus persica*) fruit. *Plant Cell Physiol.* **29**: 1361-1366.
- 47) 中川清裕・今西 実・米谷 力. 1983. チャ栽培における被覆資材と防霜防寒効果について. 奈良農試研報. **14**: 11-17.
- 48) NEVEN, L. G., D. W. HASKEL, C. L. GUY, N. DENSLow, P. A. KLEIN, L. G. GREEN and A. SILVERMAN. 1992. Association of 70-kilodalton heat-shock cognate proteins with acclimation to cold. *Plant Physiol.* **99**: 1362-1369.
- 49) O'NEILL, S. D. 1983. Osmotic adjustment and the development of freezing resistance in *Fragaria virginiana*. *Plant Physiol.* **72**: 938-944.
- 50) PEARCE, R. S. and J. H. M. WILLISON. 1985. A freeze-etch study of the effects of extracellular freezing on cellular membranes of wheat. *Planta* **163**: 304-316.
- 51) PERRAS, M. and F. SARHAN. 1984. Energy state of spring and winter wheat during cold hardening. Soluble sugars and adenine nucleotides. *Physiol. Plant.* **60**: 129-132.
- 52) POLLOCK, C. J., C. F. EAGLES and I. M. SIMS. 1988. Effect of photoperiod and irradiance changes upon development of freezing tolerance and accumulation of soluble carbohydrate in seedlings of *Lolium perenne* grown at 2 °C. *Ann. Bot.* **62**: 95-100.
- 53) POLLOCK, C. J., E. J. LLOYD, J. L. STODDART and H. THOMAS. 1983. Growth, photosynthesis and assimilate partitioning in *Lolium temulentum* exposed to chilling temperatures. *Physiol. Plant.* **59**: 257-262.
- 54) ROE, J. H. 1934. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *J. Biol. Chem.* **107**: 15-22.
- 55) 酒井 昭. 1982. 植物の耐凍性と寒冷適応. 学会出版センター, 東京.
- 56) SAKAI, A. and S. YOSHIDA. 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology* **5**: 160-174.
- 57) SALERNO, G. L. and H. G. PONTIS. 1989. Raffinose synthesis in *Chlorella vulgaris* cultures after a cold shock. *Plant Physiol.* **89**: 648-651.
- 58) SANTARIUS, K. A. 1973. The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. *Planta* **113**: 105-114.
- 59) SCHOLLES, J., N. BUNDOCK, R. WILDE and S. ROLFE. 1996. The impact of reduced vacuolar invertase activity on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of

- tomato. *Planta* **200**: 265-272.
- 60) STEPONKUS, P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 543-584.
- 61) STEPONKUS, P.L. and F.O. LANPHEAR. 1968. The relationship of carbohydrates to cold acclimation of *Hedera helix* L. cv. Thorndale. *Physiol. Plant.* **21**: 777-791.
- 62) STOUT, D. G. 1980. Alfalfa water status and cold hardiness as influenced by cold acclimation and water stress. *Plant Cell Environ.* **3**: 237-241.
- 63) SUKUMARAN, N. P. and C. J. WEISER. 1972. An excised leaflet test for evaluating potato frost tolerance. *HortScience* **7**: 467-468.
- 64) SUZUKI, A., Y. KANAYAMA and S. YAMAKI. 1996. Occurrence of two sucrose synthase isozymes during maturation of Japanese pear fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **121**: 943-947.
- 65) TIMPA, J. D., J. J. BURKE, J. E. QUISENBERRY and C. W. WENDT. 1986. Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants. *Plant Physiol.* **82**: 724-728.
- 66) TOGNETTI, J. A., P. L. CALDERÓN and H. G. PONTIS. 1989. Fructan metabolism: Reversal of cold acclimation. *J. Plant Physiol.* **134**: 232-236.
- 67) TRONSMO, A. M., G. KOBRO, S. MORGENLIE and R. FLENGSRUD. 1993. Carbohydrate content and glycosidase activities following cold hardening in two grass species. *Physiol. Plant.* **88**: 689-695.
- 68) TYLER, N. J., L. V. GUSTA and D. B. FOWLER. 1981. The effect of a water stress on the cold hardiness of winter wheat. *Can. J. Bot.* **59**: 1717-1721.
- 69) VYAS, S. P., S. KATHJU, B. K. GARG and A. N. LAHIRI. 1985. Performance and metabolic alterations in *Sesamum indicum* L. under different intensities of water stress. *Ann. Bot.* **56**: 323-331.
- 70) YELLE, S., R. T. CHETELAT, M. DORAIS, J. W. DEVERNA and A. B. BENNETT. 1991. Sink metabolism in tomato fruit. IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. *Plant Physiol.* **95**: 1026-1035.

Studies on Acquisition and Loss of Freezing Tolerance in Cabbage

Hidekazu SASAKI

Summary

Freezing tolerance is an important characteristic for overwintering plants, including cabbage (*Brassica oleracea* L.), which is one of the most important vegetables, to survive the cold. Acquisition and loss of freezing tolerance in cabbage were investigated.

The cabbage seedlings grew slowly under cold acclimation (5°C) and acquired freezing tolerance. Freezing tolerance induced by exposure to non-freezing low temperature was not attributed to ontogenetic changes, but to non-freezing low temperature. Water stress by withholding water increased the freezing tolerance of cabbage seedlings to a certain extent. The induced freezing tolerance during cold acclimation (5°C, 7 d) was lost when the seedlings were exposed to only 1 d of deacclimation at normal growth temperatures. Cabbage seedlings exposed to non-freezing low temperature under a 12 h photoperiod acquired freezing tolerance, while the plants exposed to non-freezing low temperature in the dark did not acquire freezing tolerance. On the contrary, in the case of reversal from cold acclimation, the freezing tolerance of the plants was reduced by exposure to normal growth temperature regardless of light conditions. Water stress affected the freezing tolerance of the seedlings during cold acclimation and deacclimation. The plants subjected to water stress showed an increase in freezing tolerance during cold acclimation. However, the interruption of water stress by rewatering decreased the freezing tolerance rapidly to the same level as for continually watered plants. Also during deacclimation, water stress prevented the loss of freezing tolerance of plants. The period required for deacclimation was much shorter than that for cold acclimation in cabbage seedlings and the degree of deacclimation was temperature-dependent. The short-term deacclimation was also shown in the cabbage grown in the field during winter. The head leaves of cabbage grown in winter often attained to high temperatures on sunny days due to solar radiation and the temperature rise in head leaves decreased the freezing tolerance of the leaf tissue. Short-term deacclimation of cabbage induced by high leaf temperatures could be transiently controlled by shading.

Sucrose, glucose, fructose and *myo*-inositol were detected as soluble sugars in cabbage leaves, and the concentration of all soluble sugars, except for *myo*-inositol, and starch increased gradually during cold acclimation such that their levels were positively correlated with the degree of freezing

Received : December 27, 2002

Department of Applied Plant Physiology
360 Kusawa, Ano, Mie, 514-2392 Japan

Present address:

Department of Vegetable and Floricultural Science, National Agricultural Research Center for Tohoku Region
4 Akahira, Shimokuriyagawa, Morioka 020-0198 Japan

tolerance. On the other hand, the decrease of freezing tolerance induced by deacclimation was associated with a large reduction in sugar concentration. Water stress affected sugar concentration in leaves during cold acclimation and deacclimation. Water withholding promoted the accumulation of sugars during cold acclimation and suppressed reduction of sugars during deacclimation. Activity of sucrose synthase (E.C. 2.4.1.13) and sucrose phosphate synthase (E.C. 2.4.1.14) increased during cold acclimation, but decreased to the level of activity before cold acclimation during deacclimation. However, the activity of acid invertase (E.C. 3.2.1.26) decreased gradually during cold acclimation and did not increase to the level of activity before cold acclimation during deacclimation. These results suggest that sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation and play important roles in sugar accumulation and acquisition of freezing tolerance in the leaves of cabbage seedlings.