琉球大学学術リポジトリ

連続明期と温度変化がパインアップルの CO_2 交換速度及び気孔伝導度の日変化に与える影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): CAM 植物, パインアップル, リンゴ酸, 連続明期, 気孔伝導度 キーワード (En): Crassulacean acid metabolism, Pineapple, Malic acid, Continued light period, Stomatal conductance 作成者: 川満, 芳信, 大城, 常明, 村山, 盛一, Kawamitsu, Yoshinobu, Oshiro, Tsuneaki, Murayama, Seiichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3642

連続明期と温度変化がパインアップルのCO_2交換速度及び気孔伝導度の日変化に与える影響

川満芳信*・大城常明*・村山盛一*

Yoshinobu KAWAMITSU, Tsuneaki OSHIRO and Seiichi MURAYAMA : The effect of continued light period and temperature changes on the diurnal changes in CO_2 exchange rate and stomatal conductance in pineapple.

キーワード：CAM 植物，パインアップル，リンゴ酸，連続明期，気孔伝導度
Key Words : Crassulacean acid metabolism, Pineapple, Malic acid, Continued light period, Stomatal conductance.

Summary

In CAM plants, CO_2 balance is dependent on malic acid content accumulated in the dark period, consequently the light use efficiency is low. In this paper, in order to increase the light use efficiency in pineapple plants, the diurnal changes in gas exchange parameters were examined under such conditions without dark period and of controlling temperature change. Outlines of the result are as follows;

Under the control conditions, the diurnal courses in gas exchange rate showed CAM type with four phases regardless of the change of temperature. Under the continued light period, gas exchange rate and stomatal conductance showed daily variation when temperature change was given in the transient from light to dark period. In addition, the malic acid content was decreased when the temperature changed. Light and dark period temperature gradient under the normal conditions with the dark period affected the diurnal changes in gas exchange rate and CO_2 balance. Moreover, it was recognized that the temperature shift affected storage and decarboxylation process of the malic acid content. The slope of the regression line between stomatal conductance and gas exchange rate at Phase-1 and Phase-4 was significantly different, suggesting the difference in the CO_2 fixing enzymes. Base on the hypothesis, the enzyme under the continued light period could be speculated.

From the present study, stomata is affected by the existence of dark period and temperature change, and it seems to be controlled by the increase and decrease of malic acid content.

はじめに

パインアップルなどの Crassulacean Acid Metabolism（CAM）型植物は，通常の緑色植物とは異なり，暗期に気孔を開いてCO_2を吸収し，明期の大部分は気孔を閉じCO_2交換を停止する．この CAM 型ガス交換の日変化に関して，気孔を開きCO_2吸収する暗期を Phase 1，明期開始直後の一時的なCO_2吸収期を Phase 2,

* 琉球大学農学部生物生産学科
琉球大学農学部学科報告 **48**：39～52（2001）

気孔を閉じガス交換を停止する明期をPhase 3，明期後半に気孔を開きCO_2を吸収する期間をPhase 4と呼ぶ（Osmondら，1978）．Phase 1におけるCO_2固定はホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPCase）によって，Phase 2ではPEPCaseとリブロース2リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（Rubisco）によって行われる（Kluge and Ting，1978）．Phase 3では脱炭酸されたCO_2がRubiscoで固定され，カルビン回路に取り込まれ炭水化物に合成される．Phase 4では蓄積されたリンゴ酸が枯渇し，外気から直接CO_2をカルビン回路に取り込み，炭水化物を合成する．この様に，特異的な代謝を行うCAM植物では水利用効率は高いものの，CO_2収支量は暗期のC_4ジカルボン酸回路で生成されるリンゴ酸の蓄積量に依存し，太陽エネルギー利用効率は低い．そのためパインアップルやラン等のCAM植物は，成長速度が遅く，収穫までの栽培期間が長いという欠点がある（野瀬，1979，1992）．

本報では，明期に気孔開孔が促進されればCO_2収支量がどの程度変化するかを明らかにするため，パインアップルを用い気孔開閉リズムの要因である暗期の有無および温度変化を制御してCO_2交換速度，気孔伝導度，PEPCase活性，リンゴ酸含量の日変化を調べ，検討した．

材料及び方法

供試材料は，パインアップル *Ananas comosus*（L.）Merr. cv. Smooth cayenne，系統N67-10を用いた．冠芽は一週間日陰で乾燥させ，1996年10月28日に200倍の殺菌剤（北興，ベンレートT）に2時間浸漬後，10ppmの発根促進剤（塩野義，オキシベロン）に2時間浸漬した．その後，赤色土壌（国頭マージ）を詰めたワグナーポット（1/2000a）に植え付け，ビニールハウス内で栽培した．潅水は土壌の状態を観察しながら適宜行った．施肥は液体肥料を植え付け後2週間目から1週間ごとにポット当たり500ml与えた．液肥の成分は9mM NH_4NO_3，6mM K_2SO_4，6mM $CaCl_2$，2mM KH_2PO_4，2mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，25μM H_3BO_3，10μM $MnSO_4 \cdot H_2O$，2μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，0.5μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，0.5μMH_2MoO_4，0.1mM FeNa-EDTAであった．

ガス交換速度測定方法

供試材料の地上部全体をグロースチャンバー内に設置した．光源には陽光ランプ（東芝，D-400）を用い，明期は7：00から18：00の11時間，暗期は13時間，光強度は500～600μmol m^{-2} s^{-1}に設定した．グロースチャンバー上部には深さ6.5cmのガラス製水槽を設置し光源からの熱線をカットした．また，グロースチャンバー内温度は，クールラインによって制御した．葉のガス交換速度は，D葉をアクリル製同化箱内に挟んで測定した．同化箱内温度は内部にラジエーターを設置し，クールニクス（ヤマト，CTE-82W）で温度制御した水を循環させ制御した．葉温はT型熱電対（ϕ=0.1）をクリップで葉の裏側に密着させて，同化箱内温度は同熱電対を葉の陰に置き測定した．同化箱導入空気は，コンプレッサーにより外気を取り込み，バブリング装置を通過させて水蒸気圧（湿度）を制御し，その後，ミキシングボックス内で撹拌した．続いて空気の一部はレファレンス側に，他は2台の同化箱へ供給した．同化箱への空気流入量はニードルバブルで調整し，マスフローメーター（エステック，SEF-1）で計測した．レファレンス及び同化箱出口のCO_2濃度は，CO_2赤外線分析計（LI-COR社，LI-6251）で，湿度は相対湿度計（バイサラ，HMP-113Y）で測定した．これら計測器からの信号は，ハイブリットレコーダー（横河）でAD変換後，PCへ転送され，CO_2交換速度，気孔伝導度，蒸散速度，Ci等を算出した．

光条件は暗期を有する通常日長，連続明期，連続明期後の通常日長下で，葉温は18：00～7：00を25℃，7：00～18：00を30℃に維持した25/30℃区，1日中25℃または30℃に固定した25/25℃区，30/30℃区を設けた．明期の光強度は500～600μmol m^{-2} s^{-1}であった．ガス交換速度はそれぞれの条件下で3日間連続測定した．PEPCase及び有機酸含量用サンプリングはそれぞれの条件に設置し3日目に行った．連続明期条件下で温度変化の影響を見るため，葉温を25℃に3日間維持した後，ガス交換速度を測定し，42時間後に葉温を30℃に変えた．その時のリンゴ酸含量は，ガス交換測定開始後40時間目から行い50時間目に終了した．

PEPCase活性測定

ガス交換速度を測定した葉を対象に，先端部より基部方向へ順に葉片（4cm²）を採取した．採取後反応を停止させるため，素早く液化窒素で凍結した．試料の採取はPhase 1（21:00，2:00，6:00），Phase 2（7:00，8:00），Phase 3（12:00）Phase 4（17:00）に行った．試料は，氷中で保存した抽出用緩衝液5ml（200mM Bicine-KOH（pH8.2），0.2mM EDTA，0.5mM DTT，2mMヨード酢酸，50mg Polyethylene Glycol 20000）に0.2g海砂，Polyvinylpolypyrrolidone（PVP）を加え乳鉢を用いて素早く摩砕した．その後，一層のミラクロスを用いて濾過し，その濾液（1ml）を12,000rpmで30秒間遠心分離し，その上澄み液を最終抽出液とし，その内100μlを酵素活性測定に使用した．活性はNADHの340nmにおける吸光度を分光光度計（島津製作所，UV-2200A）を用いて，25℃で行った．反応液の組成はWinter（1980）に従い，25mM Bicine-MES-MOPS-KOH（pH8.5），5mM $MgCl_2$，0.1mM NADH，2unit MDH，2mM PEPとした．リンゴ酸感受性は，反応液組成に（1）通常の反応液区，（2）2mMリンゴ酸（Malate-NaOH（pH7.0））添加区を設け，（1）に対する（2）の活性値の相対値で表した．また，0.5ml抽出液に99%アセトン2mlを加えクロロフィル含量を測定した．

有機酸含量測定

有機酸含量は，PEPCase測定用抽出液に0.5% $HClO_4$を1ml加え，冷凍保存（-40℃）した．測定当日，解凍した抽出液を3,000rpmで10分間遠心分離した．その上澄み液をメンブレンフィルター（孔径0.45μm）で濾過し，高速液体クロマトグラフィー（島津，SIL-10A，CDD-6A，LC-10A，カラムSCR-102H）を用いて定量した．

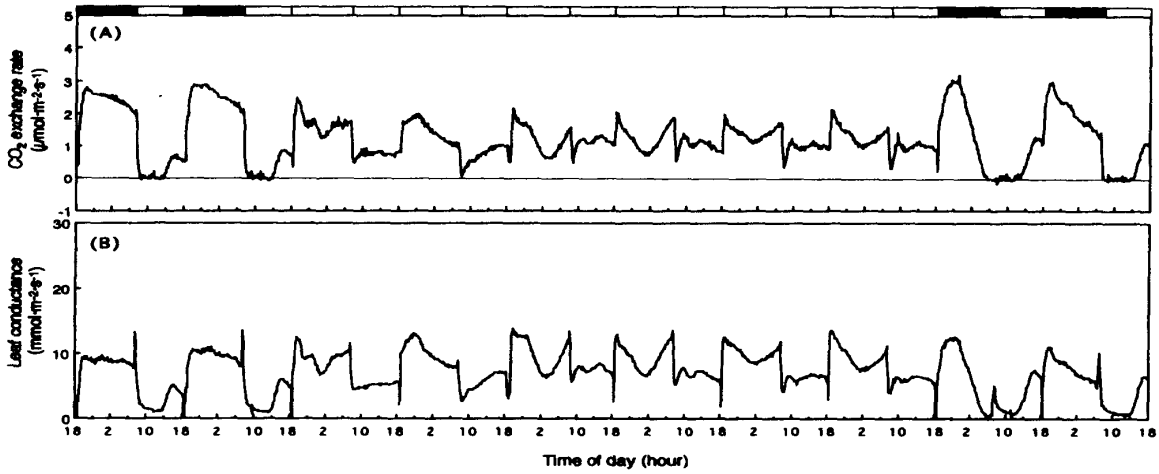

図1. 連続明期を6日間続けたときのガス交換速度(A)および気孔伝導度(B)の日変化.
注:ただし暗期のある条件下の葉温は暗期13時間の間25℃, 明期11時間の間30℃に,
連続明期下では13時間の間27℃, 明期11時間の間30℃で設定した.

結　果

連続明期を6日間続けた場合，ガス交換速度や気孔伝導度がどのように反応するか調べた（図1）．暗期のある通常日長条件下の葉温は暗期25℃，明期30℃に，連続明期条件下の葉温は夜間の13時間は27℃，昼間の11時間は30℃に設定した．暗期が存在するとパインアップルのガス交換速度および気孔伝導度は典型的なCAM型であった．連続明期に曝すと，葉温を変化させていた時間帯でガス交換速度や気孔伝導度に変化が生じ，その日変化は3日目以降で安定した．連続明期を6日間続けた後再び暗期を与えると，その直後は乱れたCAM型であったが，2日目以降は各Phaseのはっきりした CAM型に戻った．これより，3日目には一定のリズ

ムに安定することが明らかとなり，以降の連続明期処理は3日間とした．

次に，連続暗期処理がガス交換速度や気孔伝導度の日変化にどの様な影響を与えるか調べた（図2）．通常日長条件下の葉温は，暗期25℃，明期30℃であった．連続暗期下の葉温は，夜間13時間は25℃，昼間11時間は30℃に設定した．通常日長条件下のガス交換速度および気孔伝導度は典型的なCAM型であった．その後，明期を与えず暗期を与えると，ガス交換速度は約6時間程0μmol m^{-2} s^{-1}であったが，13時以降はCO_2放出に転じた．3日目に明期を与えると，完全なパインアップルのCAM型に戻った．これより，連続暗期処理中は葉にリンゴ酸を蓄積した状態で外気とのガス交換を停止させ，再び光エネルギーが供給されると脱炭酸が開始されるといえる．

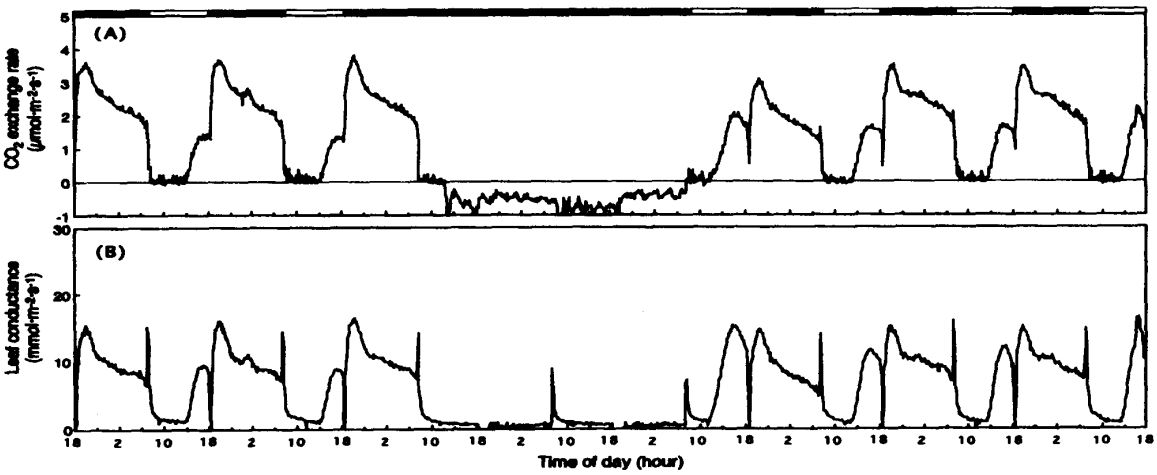

図2. 連続暗期を2日間続けたときのガス交換速度(A)および気孔伝導度(B)の日変化.
注:ただし明期のある条件下の葉温は暗期13時間の間25℃, 明期11時間の間30℃に,
連続暗期下では13時間の間25℃, 11時間の間30℃をそれぞれ維持した.

図3，4は葉温を暗期25℃，明期30℃に設定し，暗期を13時間与えた場合（上段），連続明期条件（中段），再び暗期を与えた場合（下段）のガス交換速度および気孔伝導度の日変化である．暗期のある通常日長下のガス交換速度は，暗期，明期の始め，明期の後半にCO_2を吸収する典型的なCAM型であった．連続明期下のガス交換速度は，葉温25℃では3.5μmol m^{-2} s^{-1}と高く，時間の経過と共に低下した．7：00に葉温を30℃に上昇させると，ガス交換速度は急激に減少し0μmol m^{-2} s^{-1}となり，8：00～9：00には吸収を開始した．葉温30℃のガス交換速度のMaxは1.9μmol m^{-2} s^{-1}前後で推移し，葉温25℃の値に比べ低かった．処理開始後2日目に葉温30℃から25℃に変化させると，1日目と同様に高いガス交換速度（4μmol m^{-2} s^{-1}）を示し，その後，徐々に低下した．午前4：00ごろガス交換速度は1.8μmol m^{-2} s^{-1}を示した後，徐々に増加した．午前7：00まで増加し，葉温が変化すると一時的に減少するが，8：00～9：00にかけて増加に転じた．葉温30℃時のガス交換速度は1.9μmol m^{-2} s^{-1}で1日目と同様であった．3日目は2日目と同様な日変化リズムを示した．再び暗期のある通常日長条件下のガス交換速度は，22：00頃にピーク（2.8μmol m^{-2} s^{-1}）となり，その後徐々に減少し，明期開始前に呼吸に転じた．明期の開始と共にCO_2放出は止まり，Phase 4には高いガス交換速度がみられた．2日目以降からは典型的なCAM型に戻った．気孔伝導度の日変化に対する連続明期処理の影響もガス交換速度の場合とほぼ同様であった（図4）．

図5，6は葉温を25℃に固定し，暗期を13時間与えた場合（上段），連続明期条件（中段），再び暗期を与えた場合（下段）のガス交換速度および気孔伝導度の日変化である．暗期のある条件下におけるパインアップルのガス交換速度は典型的なCAM型を示した．連続明期条件に曝すとガス交換速度は前日のPhase 4から

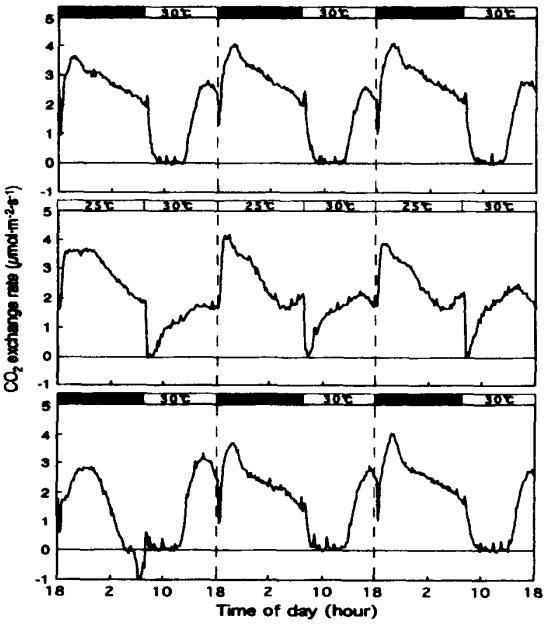

図3. 葉温を18から7時の間25℃, 7から18時の間30℃で維持した時の暗期のある条件(上段), 連続明期(中段)および再び暗期を与えた条件(下段)下でのガス交換速度の日変化.

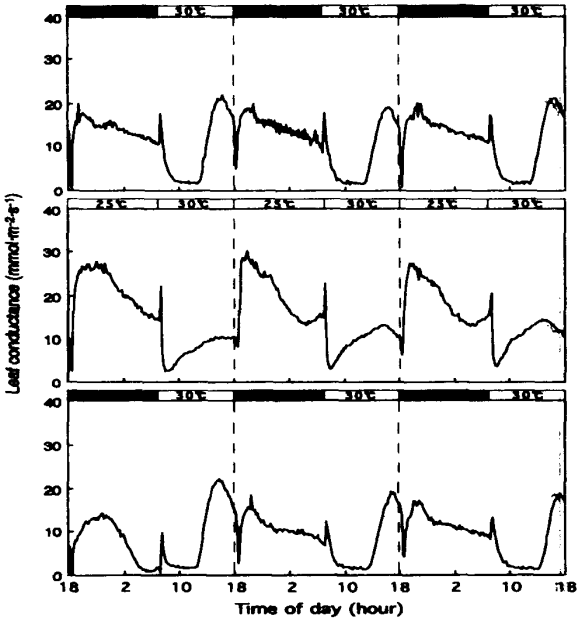

図4. 葉温を18から7時の間25℃, 7から18時の間30℃で維持した時の暗期のある条件(上段), 連続明期(中段)および再び暗期を与えた条件(下段)下での気孔伝導度の日変化.

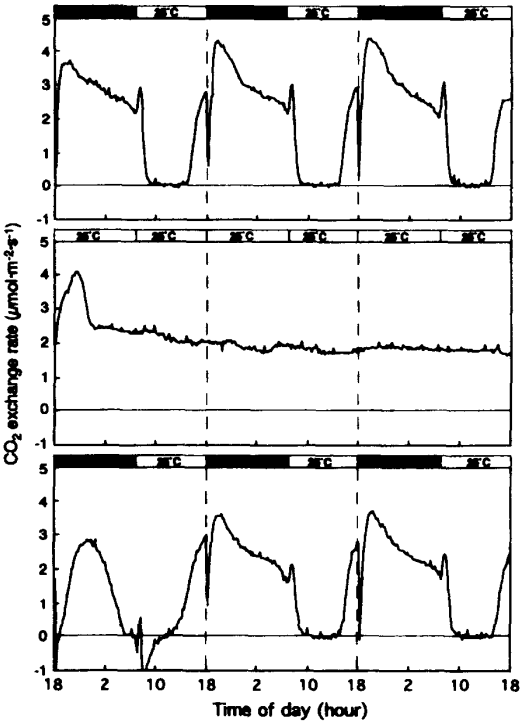

図5. 1日を通し葉温を25℃に維持した時の暗期のある条件(上段), 連続明期(中段)および再び暗期を与えた条件(下段)下でのガス交換速度の日変化.

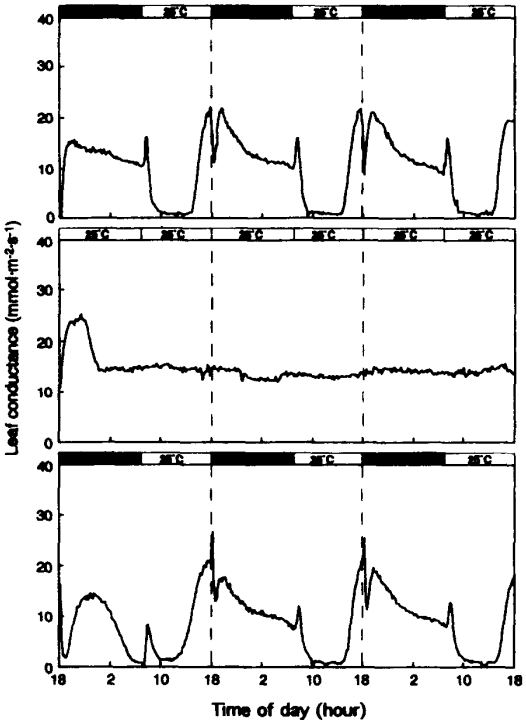

図6. 1日を通し葉温を25℃に維持した時の暗期のある条件(上段), 連続明期(中段)および再び暗期を与えた条件(下段)下での気孔伝導度の日変化.

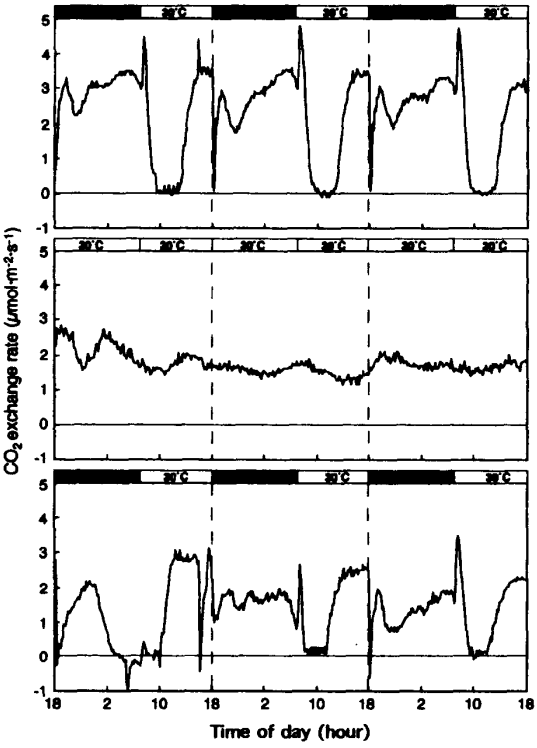

図7. 1日を通し葉温を30℃に維持した時の暗期のある条件（上段），連続明期（中段）お よび再び暗期を与えた条件（下段）下でのガス交換速度の日変化.

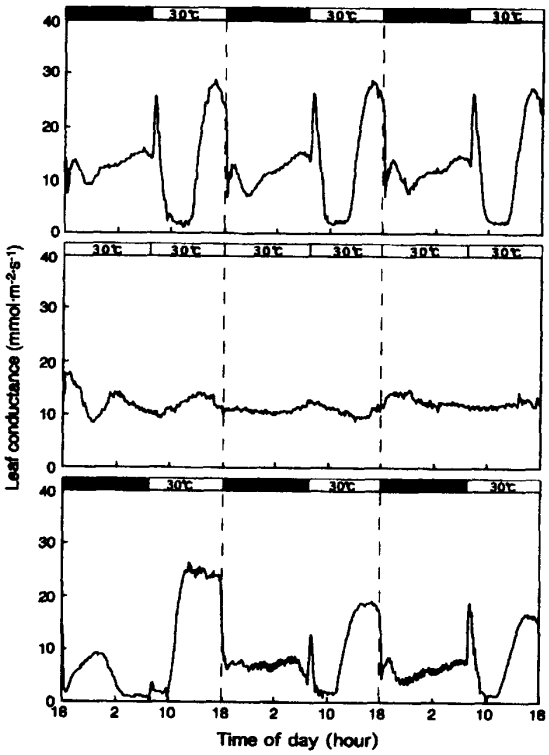

図8. 1日を通し葉温を30℃に維持した時の暗期のある条件（上段），連続明期（中段）および再び暗期を与えた条件（下段）下での気孔伝導度の日変化.

一時的に増加してピーク（4μmol m^{-2} s^{-1}）に達した後減少に転じ，2：00頃には2.3μmol m^{-2} s^{-1}で安定した．2日目以降も約2μmol m^{-2} s^{-1}で安定し，大きな日変化は認められなかった．再び暗期を与えると，ガス交換速度は増加し，24：00頃ピーク（2.8μmol m^{-2} s^{-1}）に達し，その後，減少し，明期が開始すると放出に転じた．その後，Phase 4にはガス交換速度は急速に増加した．2日目以降は連続明期処理前と同様なCAM型の日変化リズムに戻った．気孔伝導度もガス交換速度と同様な日変化を示した．

図7，8は葉温を30℃に固定し，暗期を13時間与えた場合（上段），連続明期条件（中段），再び暗期を与えた場合（下段）のガス交換速度及び気孔伝導度の日変化である．暗期のある条件下では典型的なCAM型パターンであった．連続明期処理を与えると，ガス交換速度は1.5から2.5μmol m^{-2} s^{-1}の小さな振幅が見られたが，その後安定し，2日目以降は約1.9μmol m^{-2} s^{-1}の値で推移した．連続明期処理後，暗期を再び与えるとガス交換速度は24:00頃ピーク（2.8μmol m^{-2} s^{-1}）に達し，その後，減少し明期開始前にCO_2放出に転じた．明期ではガス交換速度は放出から吸収に転じ，その後Phase 4にあたる時間帯では高い値を示した．2日目以降は連続明期処理前と同様なCAM型リズムに戻った．

暗期のある条件下で，葉温処理区毎のガス交換速度の日変化を比較した（図9）．温度処理の影響をPhase毎に比較すると，Phase 1の場合，25/30℃と25/25℃区は前半にガス交換速度のピークがみられたが，30/30℃区は後半にみられた．Phase 2では30/30℃区で最も高いガス交換速度を示し，25/25℃，25/30℃区の順で低下した．Phase 3の期間は25/25℃区で長く，30/30℃で短かった．Phase 4は25/25℃区においてその開始時間が遅れ，30/30℃区において高いガス交換速度を示した．

連続明期条件下の結果を，葉温処理区毎にガス交換速度の日変化を比較した（図10）．連続明期を開始し

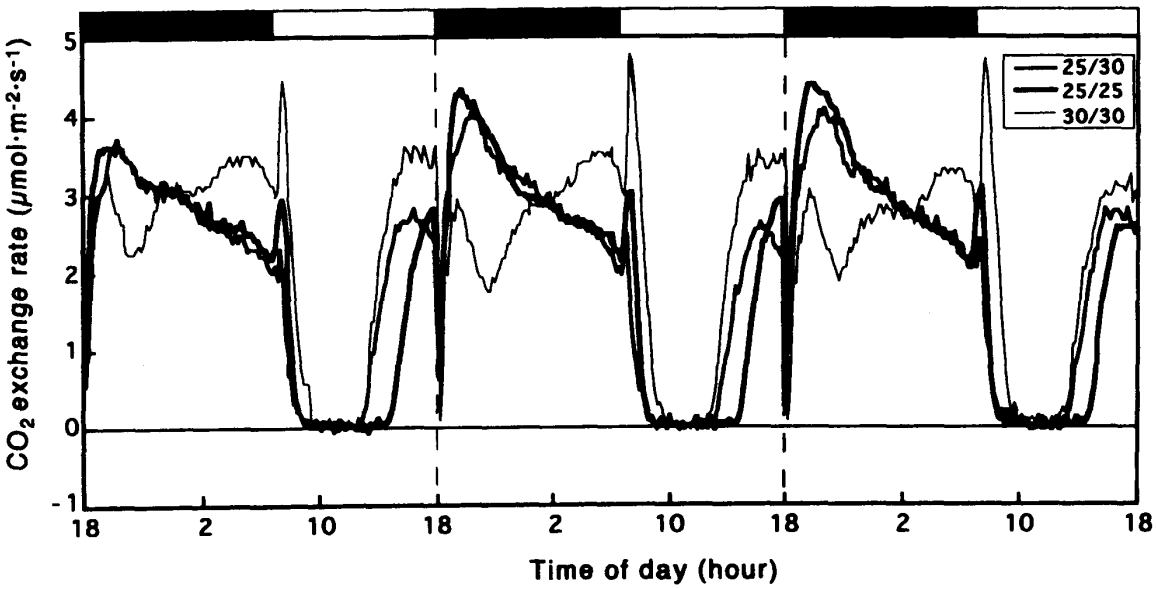

図9. 暗期がある条件下各葉温処理区間のガス交換速度.
注：測定条件は図3, 5, 7, を参照.

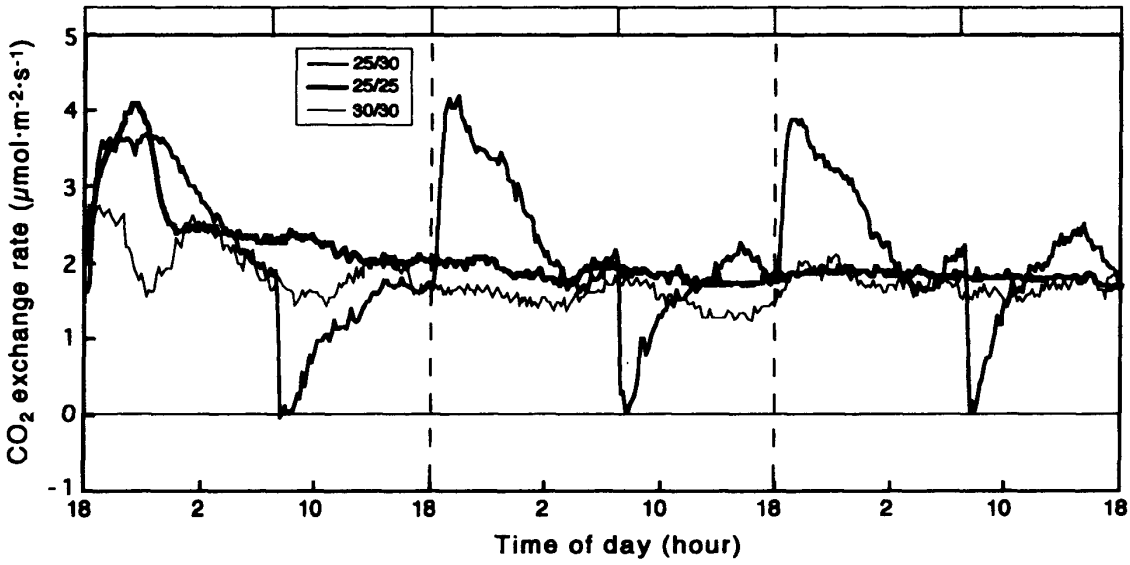

図10. 連続明期条件下における各葉温処理区間のガス交換速度の比較.
注：測定条件は図3, 5, 7を参照.

た直後はどの処理区のガス交換速度も暗期を与えた場合の日変化リズムと類似していた．25/25℃，30/30℃区は一定値で推移したが，25/30℃区は葉温が変化する時間帯で変化が見られた．

図11は暗期を与えた場合のCO_2収支量を比較したものである．一日の収支量は，30/30℃区で若干高く，25/30℃，25/25℃区の順で低下した．Phase 1では30/30℃区が他区に比べ若干低く，Phase 4では30/30℃区が高く25/25，25/25℃区の順で低下した．

CAM型光合成のKey酵素であるPEPCase活性の日変化を調べた（図12）．中段の図は反応液に2mMリンゴ酸添加区のPEPCase活性を，下段はリンゴ酸感受性を表している．25/30℃および25/25℃区におけるPEPCase活性は，Phase 1で徐々に低下しPhase 2で最低値に達し，Phase 3，4で上昇する谷型の日変化パターンを有した．25/30℃区において，Phase 1の前半とPhase 4では18μmol・mg^{-1}CHL・min^{-1}と高い活性値を示し，25/25℃区でPhase 1の前半とPhase 4で12μmol・mg^{-1}CHL・min^{-1}の値を示した．30/30℃区は他の処理区と異なり，Phase 1やPhase 4よりもPhase 2の方が高い活性値であった．2mMリンゴ酸を添加するとPEPCase活性は通常の活性値に比べ約1/4を示し，通常のPEPCase活性の日変化と類似したリンゴ酸感受性は25/30℃，30/30℃区において30%以下で推移し，リンゴ酸によるフィードバック阻害が見られた．25/30℃，30/30℃区のリンゴ酸感受性はPhase 1，Phase 2で24%とほぼ同じで，Phase 3で差が認められ，Phase 4ではほぼ同じになった．25/30℃および30/30℃区をみると，Phase 3，4の方がPhase 1，2に比べ感受性が高かった．25/25℃区におけるリンゴ酸感受性はPhase 2では40%，他のPhaseでは25%前後で推移した．

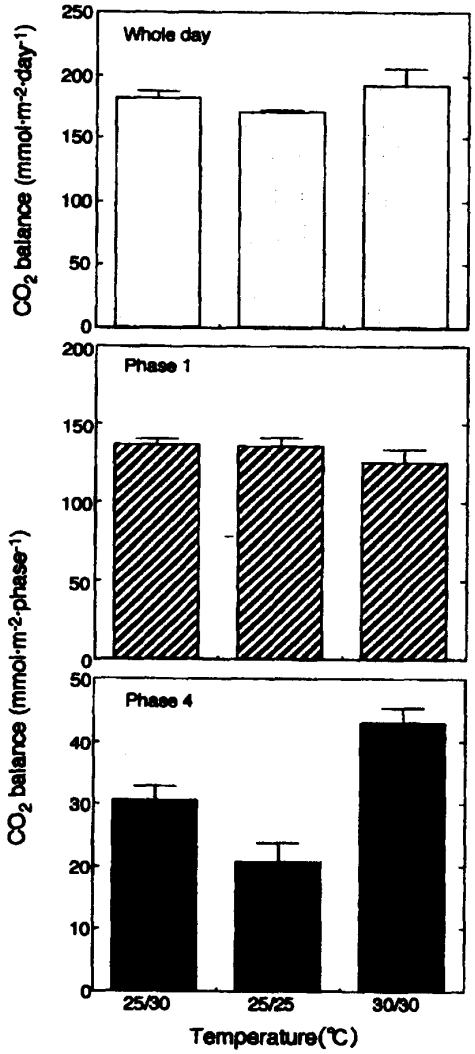

図11．暗期がある条件下で葉温処理区の1日，Phase1およびPhase4の収支量の比較．
注：図中のバーは標準偏差を表す．

図13は連続明期条件下のPEPCase活性の日変化である．PEPCase活性は，25/25℃区では約9～11μmol・mg^{-1}CHL・min^{-1}，30/30℃区では14～15μmol・mg^{-1}CHL・min^{-1}で著しい日変化はなかった．25/30℃区のPEPCase活性は，25℃から30℃に変わる時間帯に約14μmol・mg^{-1}CHL・min^{-1}と高く，それ以外は9μmol・mg^{-1}CHL・min^{-1}と比較的低かった．2mMリンゴ酸添加区のPEPCase活性は非添加値の1/4程度の活性を示し，各葉温処理区とも日変化パターンの著しい変化は認められなかった．リンゴ酸感受性は葉温25/30℃，30/30℃区において約27%で安定していた．25/25℃区のリンゴ酸感受性は6時から8時の間30%であったが，他の時間帯では20%と比較的高いリンゴ酸感受性であった．

図14は，暗期のある通常日長条件下のリンゴ酸およびクエン酸含量の日変化である．葉温処理区に関わらず，リンゴ酸の日変化は暗期に蓄積され，明期開始直前で最高値に達し，その後減少するCAM植物特有のパターンであった．25/30℃および25/25℃区のリンゴ酸含量はPhase 1の初期では約5mg・g^{-1}FWの値を示し，Phase

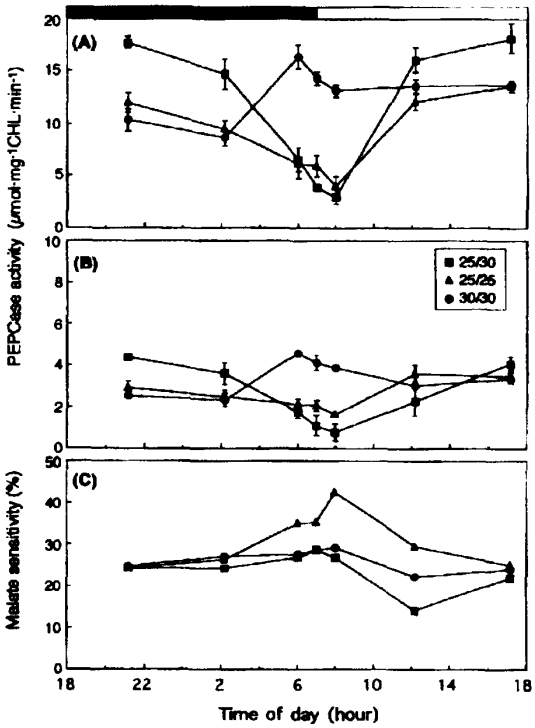

図12. 暗期がある条件下の各葉温処理区間のクロロフィル当たりのPEPCase活性(A),2mMリンゴ酸添加によるPEPCase活性(B)およびリンゴ酸感受性(C)の日変化.

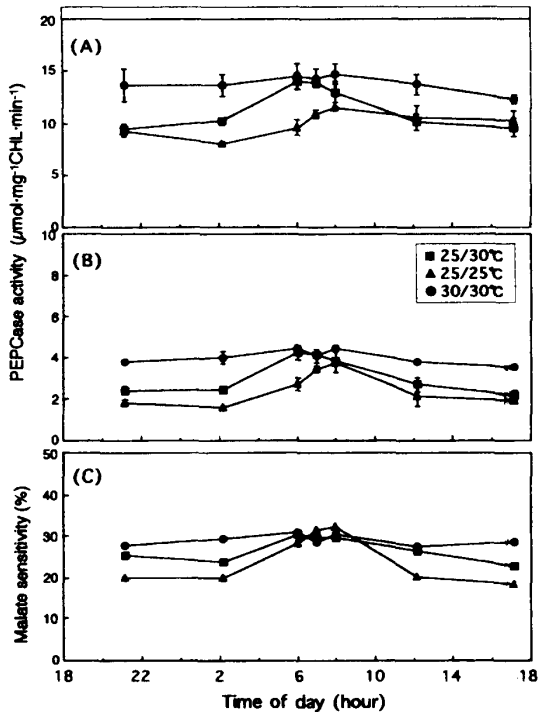

図13. 連続明期条件下の各葉温処理区間のクロロフィル当たりのPEPCase活性(A),2mMリンゴ酸添加によるPEPCase活性(B)およびリンゴ酸感受性(C)の日変化.

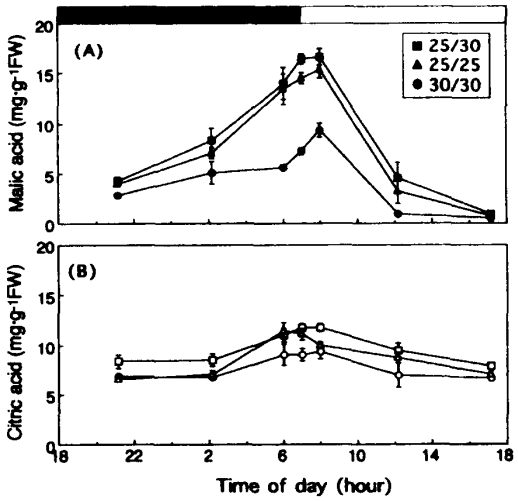

図14. 暗期がある条件下で各葉温処理区間のリンゴ酸(A)およびクエン酸(B)含量の日変化.

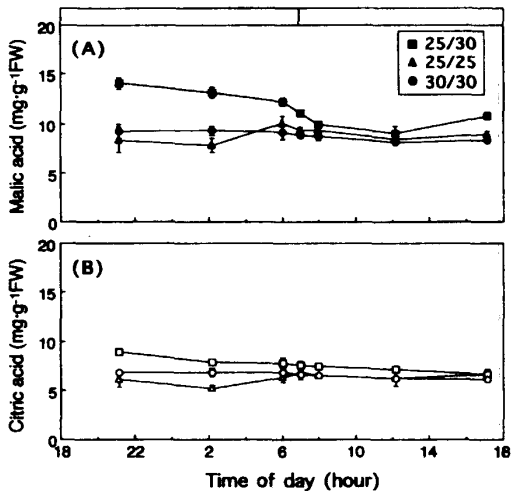

図15. 連続明期条件下で各葉温処理区間のリンゴ酸(A)およびクエン酸(B)含量の日変化.

2では差が認められるが，Phase 4では再び同じ値になった．30/30℃区のリンゴ酸含量はPhase 1の始め4mg・g^{-1}FWであるが，徐々に増加しPhase 2で他区に比べ9mg・g^{-1}FWと低く，Phase 3（12：00）では0.9mg・g^{-1}FWになった．クエン酸含量はどの処理区もPhase 2に増加する傾向がみられたが，著しい日変化ではなかった．

図15は，連続明期条件下のリンゴ酸およびクエン酸含量の日変化である．25/25℃および30/30℃区のリンゴ酸含量は約9mg・g^{-1}FWで日中を通し一定であった．25/30℃区のリンゴ酸含量は葉温が変化する時間帯に若干減少する傾向がみられた．クエン酸含量はどの処理区も日中を通し一定値で推移し，処理区間で大きな差は認められなかった．

次に，連続明期条件下で葉温を25℃に固定して3日間維持した後，30℃に上昇させた場合のガス交換速度，気孔伝導度，およびリンゴ酸含量の変化を調べた（図16）．葉温を25℃に固定するとガス交換速度および気孔伝導度は日中を通してほぼ一定値で推移した．42時間目に葉温を30℃に変えた場合，ガス交換速度および気孔伝導度は一時的に減少した後，徐々に上昇し52時間と68時間目に最大値（1.5μmol m^{-2} s^{-1}）を，60時間目に最低値（5μmol m^{-2} s^{-1}）をとる周期変動が見られた．リンゴ酸含量測定はガス交換速度測定開始後40時間目からスタートし，50時間目に終了した．連続明期下で葉温を25℃で維持していた時のリンゴ酸含量は12～10mg・g^{-1}FWの値で，葉温を30℃に変えると徐々に減少し，50時間目に7mg・g^{-1}FWに達した．

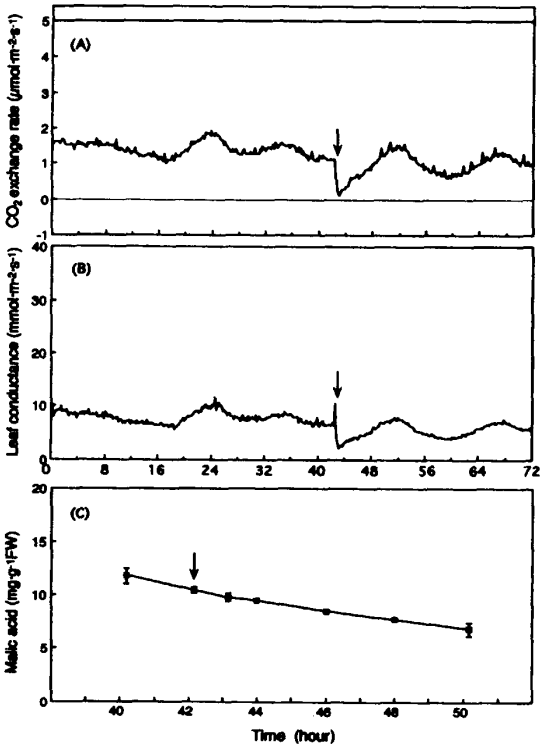

図16．連続明期下で葉温を3日間25℃に維持した後，葉温を30℃に変えたときのガス交換速度（A），気孔伝導度（B）およびリンゴ酸含有量（C）の日変化．
注：葉温変化は矢印（↓）にあたるガス交換速度測定開始42時間後に行った．0時は18時に相当．

考　察

連続明期がガス交換速度および気孔伝導度に及ぼす影響

暗期がある通常日長条件下では，温度の変化の有無に関わらず，パインアップルのガス交換速度は4つのPhaseが明確であることから，暗期の存在はCAM型光合成の維持に極めて重要であるといえる．また，明期を連続して与えると気孔は開き続け，その結果，ガス交換速度は維持される事も明らかとなった．葉温が昼夜一定の区に比べ，25/30℃区の様に温度変化があるとガス交換速度及び気孔伝導度に明確な日変化リズムが生じた．これより，光が存在しリンゴ酸含量も高い状態でもCAM植物は気孔を開き炭素固定を行い，さらに，暗期の存在に加えて温度変化も気孔閉開に影響を及ぼす要因の1つであることが示された．Gramsら（1996）は*Kalanchoe daigremontiana*を用いて，3日間植物体を連続明期に曝した後，4日目に葉温を変える操作を行い，葉温の変化でガス交換速度の増加を認めている．本報では，1日単位で葉温を変化させても連続明期下で気孔伝導度やガス交換速度は著しく変化し，CAM型日変化間ターンを維持した．

暗期に気孔が開く要因としては葉の蓄積有機酸が枯渇したためであり（Nishida，1963，1982），一方，明期において気孔が閉じるのは有機酸からの脱炭酸によって生じる葉内CO_2の上昇が関係している（Cockburnら，

1979)．Gramsら（1997）は，連続明期下で葉温を29℃から21.3℃に変えた場合，ガス交換速度が急速に高まり一定の振幅を呈する事を明らかにしている．そして，温度変化の前後のリンゴ酸含量を測定したところ，変化後に急速な上昇がみられ，その後，減少する事を認め，温度変化は液胞からのリンゴ酸の流出入をコントロールする要因として結論づけている．一方，CAM 植物に対する温度の影響はリンゴ酸貯蔵をコントロールしている液胞膜の温度依存特性と関係しているとも考えられている（Klugeら，1981）．パインアップルの場合，連続明期下での温度変化で PEPCase 活性に比べ，わずかではあるがリンゴ酸の減少が認められた（図16）．このことは液胞膜が葉温の変化に反応し，リンゴ酸の流出が促進され，細胞質中のリンゴ酸が脱炭酸され，生じた CO_2に反応して気孔が閉鎖したものと考えられる．しかし，Gramsら（1997）が行った CAM 植物の液胞でのリンゴ酸の流入出モデルでは，液胞からのリンゴ酸の流出が温度で促進されるのは，液胞内のリンゴ酸含量が最大値に達した時に生じる．本報の場合，連続明期条件下で25/30℃区のリンゴ酸含量の最大値は14mg・g^{-1}FW で，パインアップルのリンゴ酸含量の最大値は25mg・g^{-1}FW という報告（竹内，1997）もあり，液胞の最大値には達していない．

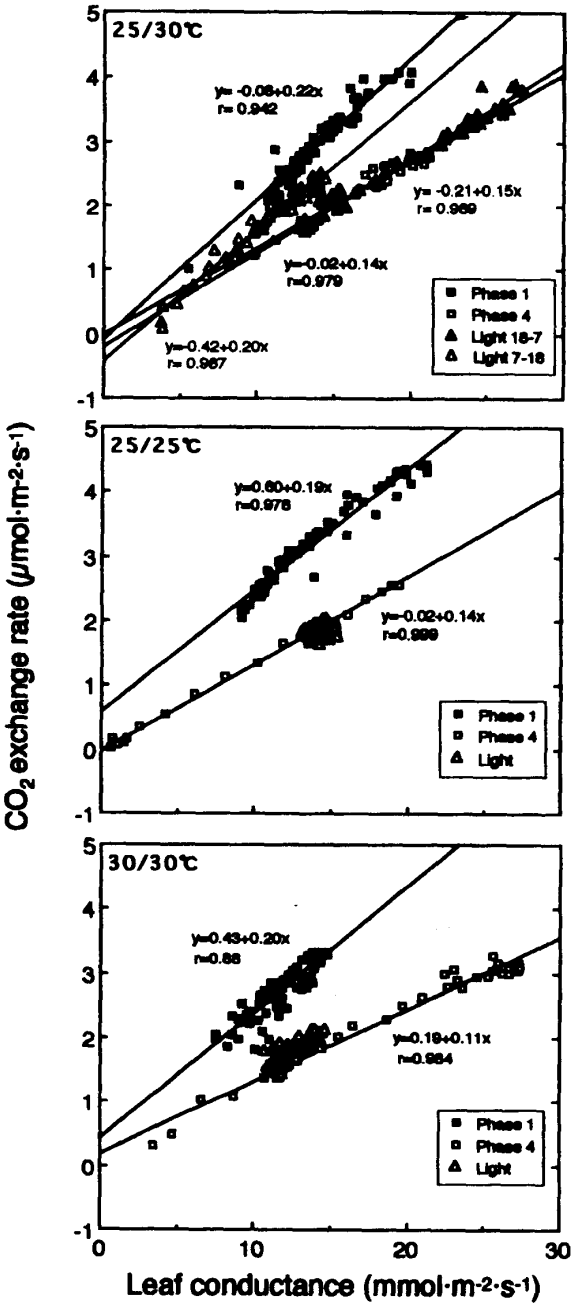

図17．暗期がある条件および連続明期下で各葉温処理区の気孔伝導度とガス交換速度との関係．
注：(■,□)はそれぞれ各葉温区の暗期のある条件下の Phase1,Phase4を表している．

暗期のある条件下で温度がガス交換速度に及ぼす影響

パインアップルのガス交換速度の日変化や CO_2収支量に対し暗明期温度の組合せは著しい影響を及ぼす（Nealesら，1980）．30/30℃区は他区とは異なり，Phase 1の後半に高いガス交換速度が見られた．この様に Phase 1の前半にガス交換速度が抑制された要因として，高夜温が PEPCase の活性化を遅延させたか，または，高夜温で呼吸が促進され生じた CO_2の再固定化（川満，1990）も考えられる．30/30℃区において Phase 1の後半に高いガス交換速度が生じた原因として，初期に蓄積されるリンゴ酸含量が低く，そのため PEPCase のフィードバック阻害が軽減され，暗期の後半に至っても高い活性値を維持できたと考えられる．しかし，30/30℃区の Phase 1の CO_2収支量は他区に比べ低く，リンゴ酸含量も低い．このことから，リンゴ酸以外の有機酸に CO_2を分配しているとも考えられるが，同時に測定されたクエン酸含量の変化は小さく，他の有機酸や物質の関与が予想される．また，Phase 4で高いガス交換速度が発生した原因として，Phase 1の低いガス交換速度やリンゴ酸含量の減少が考えられる．明期の温度が高い場合，脱炭酸

が促進されるとの報告（Moradshahiら，1977）もあり，早い時期にリンゴ酸が消失し，Rubiscoの基質が外部に依存する時間帯が早まったためと考えられる．25/25および30/30℃区は葉温が変化する区に比べPhase 2で高いガス交換速度を示し，特に，30/30℃区ではPhase 2の時間も長くなった．これは，Phase 2では液胞から細胞質へリンゴ酸の流出が温度変化で促進され，一方，25/25℃，30/30℃区では温度変化もなくPhase 3の開始が遅れたと考えられる．

気孔伝導度とガス交換速度との関係

CAM植物において気孔伝導度はガス交換速度と同調して変化するが，両者の関係はほぼ直線で回帰できる（図17）．しかし，気孔伝導度とガス交換速度との関係は，Phase 1とPhase 4では回帰直線の傾きが異なる．温度処理区毎にPhase 1とPhase 4を比較すると，ほぼ傾きは同じで前者が0.19～0.22，後者が0.11～0.14で，明期暗期温度の組み合わせの影響は見受けられない．一方，デンドロビュウムの場合，明期20℃でPhase 1における気孔伝導度とガス交換速度との関係は，他の明期温度処理区に比べ直線の傾きは小さい（関塚ら，1996）．本実験では低温処理区や高温処理区の幅が小さかったため，温度の影響が顕著でなかったと考えられる．

次に，Phase 1とPhase 4の気孔伝導度とガス交換速度の回帰直線の傾が異なる原因について考察する．CAM植物のガス交換速度は暗期と明期の温度の違いにより生じる葉面飽差の変化に対しても敏感に反応する（川満ら，1989，1994）．しかし，25/25℃や30/30℃では葉面飽差は一定に維持されているにも関わらず，Phase 1とPhase 4で回帰直線が異なったことから，葉面飽差の影響は完全に無視できる．Phase 1におけるガス交換速度を支配する酵素はPEPCaseで，Phase 4では主にRubiscoである（Winter and Smith，1996）．また，CO_2に対する親和性はRubiscoに比べPEPCaseで高く，CO_2固定効率は高い（Winter and Smith，1996）．さらにKawamitsuら（1987）は数種のC_3，C_4植物を用い，光合成速度や気孔伝導度に対する葉面飽差の影響を検討した結果，気孔伝導度と光合成速度との関係は，C_3，C_4植物間で異なる直線回帰となることを報告している．CO_2を固定する酵素はC_3植物ではRubiscoであり，C_4植物ではPEPCaseである．従って，パインアップルのPhase 1とPhase 4における直線の傾きは，CO_2固定酵素の活性値に支配され，Phase 1のそれは主にPEPCaseに，Phase 4のそれはRubiscoに関連すると考えられる．次に，連続明期条件下3日目の気孔伝導度とガス交換速度との関係をプロットしたところ，25/25℃および30/30℃区はPhase 4の直線に一致し，Rubiscoに支配されていると考えられる．25/30℃区においては25℃の場合，18～7時の間はRubiscoに，30℃の7～18時の間はPEPCaseに支配され，Y切片の異なる回帰直線が得られた．このことから，連続明期下において葉温が25℃から30℃へ変化するとCO_2を固定する酵素の活性程度を変更させ，明期下でもPEPCaseが機能するようになると考えられる．ところで，PEPCaseが機能すれば液胞へのリンゴ酸の蓄積が生じると考えられるが，連続明期下で葉温を25℃から30℃に変化させてもリンゴ酸含量は減少した．その理由として，生成されたリンゴ酸は液胞に蓄積されず，直接脱炭酸作用を受け変化しなかったとも考えられる．

連続明期下のPEPCase活性の日変化をみると（図13），25/30℃区で若干の変化が見られるが，他の処理区はほとんど変化せず，1日を通して高い活性値を維持していた．このように，PEPCase活性は高い状態にあるものの，気孔伝導度とガス交換速度との関係からCO_2はRubiscoによって固定されていることが示された．その理由として，活性の測定に関して酵素を活性化させた状態で測定したため，intactでは活性化されていない酵素がin vitroで活性化されたとも考えられ，今後詳細に調べる予定である．

摘　要

CAM植物は，炭素固定能力が低く，また，1日のCO_2収支量は暗期に蓄積されるリンゴ酸含量に依存し，太陽エネルギー利用効率は低い．本報では，パインアップルを明期に開孔させ光エネルギー利用効率を高めるため，暗期の有無や温度変化を制御して検討した．結果の概要は以下の通りである．

1) 通常の日長条件下では，ガス交換速度は温度の変化に関係なく，4つのPhaseを有する典型的なCAM型を示した．連続明期条件下に曝した場合，ガス交換速度および気孔伝導度は日変化を維持した．明期と暗期で温度変化を与えた場合，リンゴ酸含量は低下した．
2) 暗期のある条件下での明期暗期温度差はガス交換速度の日変化やCO_2収支量に影響を与えた．また，リンゴ酸含量の蓄積や脱炭酸過程に温度は影響を与えた．
3) 気孔伝導度とガス交換速度との関係をプロットしたところ，Phase 1とPhase 4でそれぞれ傾きの異なる回帰直線が得られた．回帰直線の傾きはCO_2固定酵素の違いを反映し，連続明期下におけるCO_2固定酵素の特定が可能であった．

以上より，気孔は暗期の存在，温度変化によって影響を受け，また，リンゴ酸の増減によってコントロールされていると考えられ，明期に気孔を開かせる条件として明期暗期の温度差が無くリンゴ酸の蓄積を抑制する方法で達成できると予想される．

参考文献

Cocburn, W., I. P. Ting and L. O. Sterunberg 1979. Relationship between stomatal behavior and internal carbon dioxide concentration in CAM plants. Plant Physiol. 63 : 1029-1032.

Grams, T. E. E., F. Beck and U. Luttge 1996. Generation of rhythmic and arrhythmic behavior of Crassulacean acid metabolism in *Kalanchoe daigremontiana* under continuous light by varying the irradiance or temperature : Measurements in vivo and model simulations. Planta. 198 : 110-117.

Grams, T. E. E., A. M. Borland, A. Robert, H. Griffiths, F. Beck and U. Luttge 1997. On the mechanism of reinitiation of endogenous crassulacean acid metabolism rhythm by temperature changes. Plant Physiol. 113 : 1309-1317.

Kawamitsu, Y., W. Agata, and S. Miura 1987. Effects of vapor pressure difference on CO_2 assimilation rate, leaf conductance and water use efficiency in grass species. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 31 (1・2) : 1-10.

川満芳信・縣 和一 1989. CAM植物のCO_2交換速度，蒸散速度および拡散伝導度に及ぼす空気湿度の影響．九大農学芸誌．43 (3・4) : 145-159.

川満芳信・原島浩一・野瀬昭博・村山盛一 1990. 気相型酸素電極法によるCAM植物の温度呼吸反応の評価．日作紀．59 (別1) : 232-233.

川満芳信・安部俊輔・野瀬昭博・川本恵子 1994. 高夜温によるCAM植物の夜間のCO_2吸収の停止に対する葉面飽差の影響．日作紀．63 (別2) : 109-110.

Kluge, M. and I. P. Ting 1978. Crassulacean acid metabolism. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 1-209.

Kluge, M., C. Bohlke and O. Queiroz 1981. Crassulacean acid metabolism (CAM) in Kalanchoe : Changes in intercellular CO_2 concentration during a normal CAM cycle and during cycles in continuous light or darkness. Planta. 152 : 87-92.

Moradshahi, A., H. Vines, and J. C. Black 1977. CO_2 exchange and acidity leaves in detached pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. Leaves during the day at various temperatures, O_2 and CO_2 concentrations. Planta Physiol. 59 (2) : 274-278.

Neales, T. F., P. J. M. Sale and C. P. Meyer 1980. Carbon Dioxide assimilation by pineapple plants, *Ananas comosus* (L.) Merr. II. Effects of variation of the day/night temperature regime. Aust. J. Plant Physiol. 7 : 375-385.

Nishida, K. 1963. Studies on stomatal movement of crassulacean plants in relation to the acid metabolism. Physiol. Plant. 16 : 281-298.

Nishida, K. 1982. Relationships between CO_2 concentration within the leaf and photosynthesis during deacidification in a CAM plant, *Kalanchoe pinnatum*. Physiol. Plant. 54 : 451-454.

野瀬昭博 1979. CAM 植物における光合成作用とその制御. 農業技術. 34 : 341-347.

野瀬昭博 1992. CAM 型光合成の変異と制御. 日作紀 61 : 161-171.

Osmond, C. B. 1978. Crassulacean acid metabolism : A curiosity in context. Ann. Rev. Plant Physiol. 29 : 379- 414.

関塚史朗 1996. ファレノプレス系デンドロブウムの Crassulacean Acid Metabolism 型光合成に関する研究. 沖縄県農業試験場研究報告 17 : 1-70.

竹内誠人 1997. パインアップルおよびセイロンベンケイそうのガス交換と PEPCase に与える温度, 炭酸ガス濃度の影響に関する研究. 琉球大学農学部修士論文.

Winter, K. 1980. Day/night changes in the sensitivity of phosphoenolpyruvate carboxylase to malate during crassulacean acid metabolism. Plant Physiol. 65 : 792-796.

Winter, K. and J. A. C. Smith 1996. Crassulacean acid metabolism: Current status and perspectives. Ecological studies 144. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.