

紫外線励起光照射後の遅延蛍光計測によるダイズ種子における老化の評価

誌名	植物環境工学
ISSN	18802028
著者名	壇,和弘 大和,陽一 今田,成雄 杉江,正美
発行元	日本植物工場学会
巻/号	26巻3号
掲載ページ	p. 154-159
発行年月	2014年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



紫外線励起光照射後の遅延蛍光計測による ダイズ種子における老化の評価

壇 和弘¹・大和陽一¹・今田成雄²・杉江正美³

¹ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター 839-8503
福岡県久留米市御井町 1823-1

² 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 514-2392 三重県津市安濃町草生 360

³ 浜松ホトニクス株式会社 438-0193 静岡県磐田市下神増 314-5

Estimation of Aging of Soybean Seeds by Measurement of Delayed Fluorescence after Irradiating with UV-excited Light

Kazuhiro DAN¹, Yoichi YAMATO¹, Shigeo IMADA² and Masami SUGIE³

¹NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, Mii, 1823-1, Kurume, Fukuoka, 839-8503

²NARO Institute of Vegetable and Tea Science, Kusawa, 360, Ano, Tsu, Mie, 514-2392

³Hamamatsu Photonics K. K., Shimokanzo 314-5, Iwata, Shizuoka, 438-0193

Abstract

The delayed fluorescence intensity emitted from soybean cv. 'Fukuyutaka' seeds irradiated with UV-excited light was measured using a photon detection unit. When seeds were stored at room temperature without packaging for 1 year, the percentages of germination and emergence were lower. Additionally, the delayed fluorescence intensity was higher than when seeds were stored at 5 °C with vacuum packaging. Seeds underwent accelerated aging when stored at 30 °C with greater than 95 % relative humidity for 7 and 14 days. The accelerated aging was accompanied by lower germination percentage, and the delayed fluorescence intensity was higher. A significant negative correlation was observed between the germination percentage and the delayed fluorescence intensity from seeds stored at 5 °C with vacuum packaging, those stored at room temperature without packaging, and those that were stored at 30 °C with greater than 95 % relative humidity. The delayed fluorescence intensity from the seeds increased as the germination percentage decreased. These results suggest that measuring the delayed fluorescence intensity from soybean seeds irradiated with UV-excited light can estimate their aging.

Keywords: aging, delayed fluorescence, soybean seed, UV-excited light

緒 言

作物の種子は利用されるまで貯蔵されるが、貯蔵条件が適切でない場合、種子は老化し、品質および発芽能力が低下する¹⁾。そのため、種子の老化程度は発芽試験により判定できる²⁾。しかし、発芽試験では、結果を得るまでに数日間を要し、破壊的検査であるため、個々の種子の老化程度は判

2013年11月22日受付

2014年4月9日受理

Corresponding author: Yoichi Yamato

(yyamato@affrc.go.jp)

定できない。また、ある程度の種子数を必要とする³⁾ことから、種子数が限られているような貴重な種子については行うことができない。農林水産省は、農業生物遺伝子バンク事業で、遺伝資源として収集した種子を保存しているが、発芽率を随時モニターし、発芽率が低下、あるいは種子数が減少した場合には増殖を図っている⁴⁾。発芽率のモニターは種子数を減少させることになり、効率的に種子を保存するためには、迅速かつ非破壊的な種子の老化程度の評価手法の開発が望まれる。

発芽試験の他に、発芽能力を検定するため、古くから多くの研究が行われている。例えば、カタラーゼなどの酵素活性を測定する方法⁵⁾、生細胞、あるいは死細胞に対して特異的に呈色反応を示すテトラソリウムのような試薬中に種子を浸漬する方法²⁾や種子からの浸出液の電気伝導度を測定する方法⁶⁾などが報告されている。これらの方法では、短時間のうちに結果を得ることができるが、いずれも破壊的検査である。

一方、食品分野では、物質からの微弱な蛍光を計測することにより品質を評価しようとする試みが行われており、油脂類の劣化度の判定^{7,8)}や清酒の熟度および抗酸化能の評価⁹⁾、ならびに米の品質評価¹⁰⁻¹³⁾での利用が報告されている。

また、乾燥した種子に吸水させると微弱な蛍光発光が認められ、その蛍光の強度を測定することで、種子の老化程度や発芽能力を評価できることが示唆されている^{14,15)}。しかし、この方法も、種子に吸水させる必要があることから、破壊的検査であるとともに、蛍光の強度が低いため、計測に時間を要する。

一方、八谷ら¹⁰⁾は、玄米の貯蔵温度が高く、貯蔵期間が長いほど、紫外線を照射した時に玄米から発生する蛍光強度は高くなることを報告している。このことから、紫外線を励起光として照射すると、種子に吸水させなくても蛍光の発光量が増加し、その蛍光の強度を測定することで、種子の老化程度を非破壊的に評価できると推察した。

そこで、本研究では、種子の老化程度の迅速かつ非破壊的な評価手法の開発を目的とし、老化程度が異なると考えられるダイズ種子に紫外線を励起光として照射することにより発生する蛍光の強度と老化に伴う発芽率の低下との関係について検討した。

材料および方法

1. 供試材料

三重大学生物資源学部実験圃場（三重県津市）で収穫したダイズ‘フクユタカ’の成熟種子を、シリカゲルを入れたデシケーター内で含水率が11～12%になるまで乾燥させた。実験には、入手した種子のうち平均重量±5%以内（種子重295～325mg）のものを供試した。

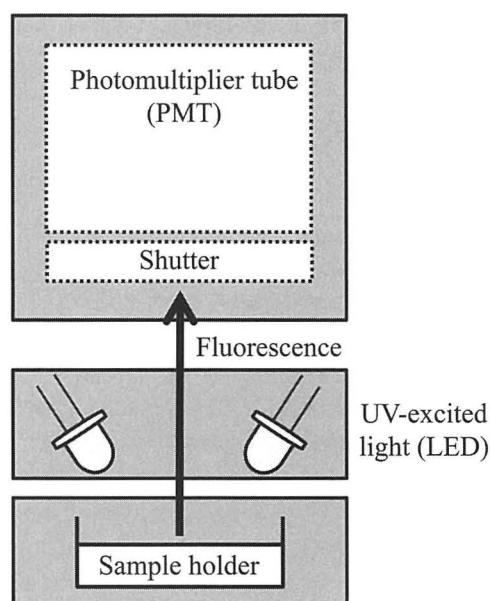


Fig. 1 Schematic of the photon counting unit with the UV-excited light source.

1) 種子の保存条件

種子を、エチレン-ビニルアルコール共重合樹脂とポリエチレンの複層フィルム（厚さ0.065mm）の袋に入れて脱気・密封し、冷蔵庫（以下、密封・冷蔵）、あるいは包装せずに温度および湿度なりゆきの室内（以下、無包装・室内）で、2002年12月1日～2003年12月15日まで1年間保存した。

2) 種子の老化促進処理

気温30℃、相対湿度95%以上の条件下で、2004年1月7日から7または14日間種子を保存する老化促進処理を行った。処理後、シリカゲルを入れたデシケーター内で種子の含水率が11～12%になるまで再び乾燥させた。

2. 種子からの遅延蛍光の計測

種子からの蛍光の計測には、紫外線励起光源（UV-LED、波長375nm、出力5mW cm⁻²）と遮光用シャッターを取り付けた微弱発光計数装置（C9692-03、浜松ホトニクス；Fig. 1）を用いた。密封・冷蔵および無包装・室内保存した種子、ならびに無処理および老化促進処理を行った種子をサンプルホルダーに入れ、1、5および10秒間紫外線励起光を照射した。照射終了1～3秒後にシャッターを開き、光電子増倍管（シングルフォトンカウンティング方式、検出波長範囲185～650nm、有効計数率2×10⁶ counts s⁻¹以下）により遅延蛍光を検出した。25℃一定の条件下で、試験区当たり種子20粒について、1粒ずつの遅延蛍光を計測した。また、紫外線励起光を照射していない種子からの蛍光の自家発光についても計測を行った。

Table 1 Effects of soybean seed storage conditions on percentages of germination and emergence.

Storage condition	Germination percentage (%)	Emergence percentage (%)
At 5 °C with vacuum packaging	100	98.3
At room temperature without packaging	93.3	68.3
<i>t</i> -test	*	*

* indicates significant difference at $P < 0.05$ by *t*-test.

3. 発芽率および出芽率の調査

種子 20 粒を 0.5 % 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 分間浸漬し、蒸留水で洗浄した。その後、蒸留水で湿らせた濾紙を敷いたシャーレ（直径 15 cm）に種子間隔 2.5 cm で並べて、25 °C・暗黒条件の恒温器内で発芽させた。発芽には至らないが、吸水した種子の膨張による幼根の伸長と発芽による種子からの幼根伸長を区別するために、目視により幼根が 5 mm 程度以上に伸長している個体を発芽とみなし、7 日後に発芽率を調査した。調査は 3 反復行った。なお、発芽率の調査には遅延蛍光の測定に用いた種子とは異なる種子を用いた。

同様に、0.5 % 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬後、蒸留水で洗浄した種子 20 粒を、市販の培養土（園芸培土、クレハ）を入れた播種箱（24×30×7.3 cm）に種子間隔 4 cm、深さ 3 cm となるように播種した。播種後、十分に灌水し、12 時間日長（陽光ランプを光源とし、培養土表面での光合成有効放射束密度は $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）、明期 25 °C / 暗期 20 °C のグロースチェンバー内で出芽させた。幼根が伸長し、その後に子葉が地上部に出現することを出芽とみなし、7 日後に子葉が培地表面から完全に出現した健全な個体数から出芽率を調査した。調査は 3 反復行った。なお、出芽率の調査には遅延蛍光の測定に用いた種子とは異なる種子を用いた。

結果および考察

1. 発芽率、出芽率および遅延蛍光強度に及ぼす種子の保存条件の影響

密封・冷蔵保存した種子の発芽率は 100 %、出芽率は 98.3 % であった（Table 1）。一方、無包装・室内保存した種子の発芽率および出芽率は、それぞれ 93.3 % および 68.3 % であり、ともに密封・冷蔵保存した種子より有意に低かった。このことから、無包装・室内保存した種子は、密封・冷蔵保存した種子よりも老化していると考えられた。

密封・冷蔵および無包装・室内保存した種子に 1、5 および 10 秒間紫外線励起光を照射し、遅延蛍光を計測した。予備的な実験として、紫外線励起光照射時の蛍光強度を測定

したところ、蛍光強度は高く、本研究で用いた光電子増倍管の有効検出率の上限である $2 \times 10^6 \text{ counts s}^{-1}$ を大きく超えた（データ略）ため、蛍光の計測は励起光照射 1 ~ 3 秒後に行った。励起光を照射した種子からの遅延蛍光強度は、いずれの照射時間においても、励起光照射後の時間の経過とともに低下した（Fig. 2）。無包装・室内保存した種子からの遅延蛍光強度は、いずれの励起光照射時間においても、密封・冷蔵保存した種子からのものよりも有意に高く推移した。1 年間無包装・室内保存することで、発芽率および出芽率が低下し、老化していると考えられる種子からの遅延蛍光強度は高くなることが示された。

また、励起光を照射していない種子からの蛍光の自家発光は極めて弱く、密封・冷蔵および無包装・室内保存した種子の間に違いは認められなかった（データ略）。

これらのことから、種子に紫外線励起光を照射した後の遅延蛍光強度を比較することで、種子の老化程度の違いを評価できると考えられた。

一方、密封・冷蔵および無包装・室内保存した種子からの遅延蛍光強度は、励起光の照射時間が長いほど、高く推移した。本研究で用いた蛍光発光の検出器の有効計数率の上限は $2 \times 10^6 \text{ counts s}^{-1}$ であり、それを超えない範囲で計測を行うために、次の実験では紫外線励起光の照射時間を 5 秒とした。

2. 発芽率および遅延蛍光強度に及ぼす種子への老化促進処理の影響

老化促進処理を行わなかった無処理の種子の発芽率は 100 % であり、7 および 14 日間の老化促進処理により発芽率はそれぞれ 98.3 % および 91.7 % に低下した（Table 2）。分散分析の結果、発芽率には老化促進処理期間の有意な影響が認められた。処理日数と発芽率との間の 1 次の関係は有意ではなかったが、老化促進処理により発芽率は低下した。種子を高温・高湿度条件下で保存する老化促進処理により、普通であれば数か月ないし数年を要する種子の老化を短時日の間に再現することができる¹⁶⁻²⁰⁾。本研究での老化促進処理は 7 ~ 14 日の短期間であったが、発芽率は低下し、種子の老化は進行しているものと考えられた。

無処理、ならびに 7 および 14 日間の老化促進処理を行っ

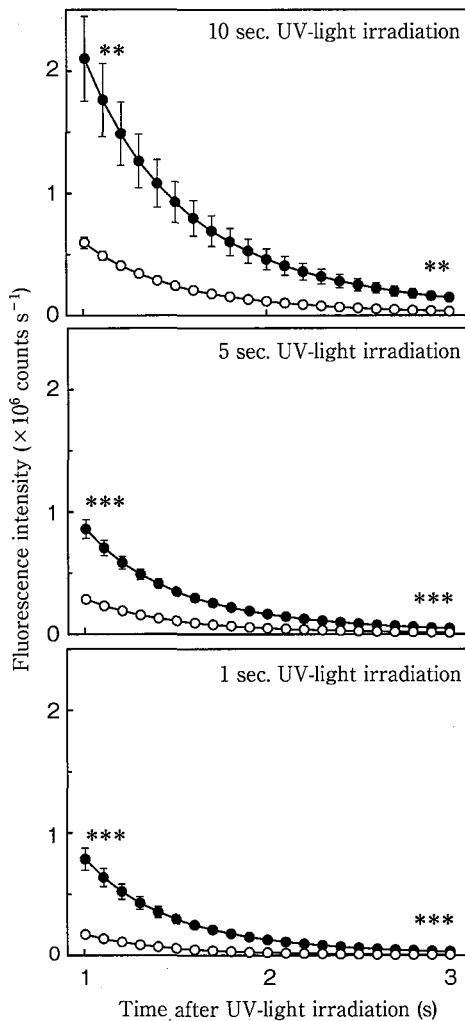


Fig. 2 Time courses of delayed fluorescence intensity from soybean seeds stored at 5 °C with vacuum packaging (○) and room temperature without packaging (●) for 1 year. Seeds were irradiated with UV-excited light for 1, 5 and 10 seconds. Vertical bars indicate SE (n=20). ** and *** indicate significant difference at $P < 0.01$ and 0.001 by t -test, respectively.

た種子に5秒間紫外線励起光を照射し、遅延蛍光を計測した。遅延蛍光強度は、無処理より7日間処理で、7日間処理より14日間処理で、有意に高く推移した (Fig. 3)。発芽率が低下し、老化が進行していると考えられる種子ほど、紫外線励起光照射後の遅延蛍光強度は高く推移すると考えられた。

3. 発芽率と遅延蛍光強度との関係

密封・冷蔵および無包装・室内保存した種子、ならびに老化促進処理を行った種子について、発芽率と励起光照射

Table 2 Effect of accelerated aging duration on the germination percentage of soybean seeds.

Accelerated aging duration (days)	Germination percentage (%)
0	100
7	98.3
14	91.7
ANOVA	*
Linear	ns

* indicates significant difference at $P < 0.05$ by ANOVA; ns indicates non-significance.

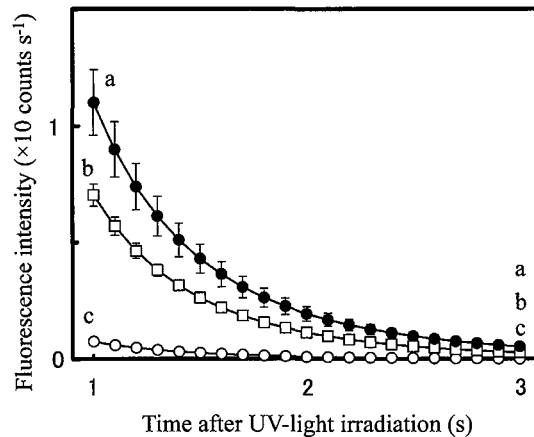


Fig. 3 Time courses of delayed fluorescence intensity from soybean seeds undergoing accelerated aging for 0 (○; control), 7 (□) and 14 (●) days. Seeds were irradiated with UV-excited light for 5 seconds. Vertical bars indicate SE (n=20). Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ by Tukey's test.

1秒後の遅延蛍光強度との相関分析を行った。その結果、両者の間には有意な負の相関関係が認められ、発芽率の低下に伴って遅延蛍光強度は上昇する傾向にあった (Fig. 4)。従って、紫外線励起光を照射した後のダイズ種子からの遅延蛍光強度を計測することで、発芽率の低下、すなわち種子の老化を評価できると考えられた。また、密封・冷蔵保存した種子の出芽率は98.3%であったのに対し、無包装・室内保存した種子では68.3%と大きく低下し、老化が進行していると考えられた。しかし、両者の発芽率はそれぞれ100%および93.3%であり、差は小さかった。一方、両者の励起光照射1秒後の遅延蛍光強度には2倍以上の差が認められ、遅延蛍光を計測することにより、発芽試験以上に高い精度で初期の種子の老化を評価できることが示唆された。

本研究では、遅延蛍光の計測と発芽率および出芽率の調査には異なる種子を用いたが、この方法では、迅速・簡便かつ非破壊的に種子の老化程度を評価できると考えられた。

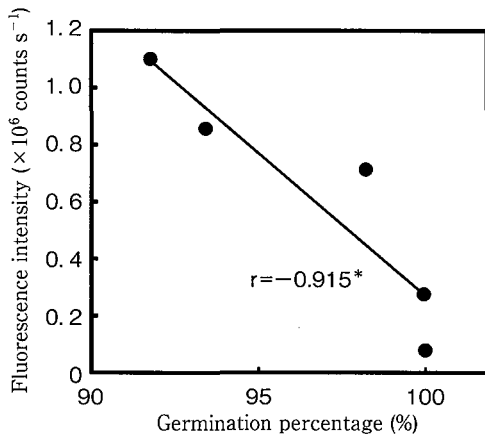


Fig. 4 Relationship between germination percentage and delayed fluorescence intensity from soybean seeds stored at 5 °C with vacuum packaging, those stored at room temperature without packaging, and those that were stored at 30 °C with greater than 95 % relative humidity. Delayed fluorescence intensity from the seeds were measured 1 second after irradiating with UV-excited light for 5 seconds. * indicate significance at $P < 0.05$.

め、保存した種子の品質をモニタリング、あるいは種子の保存条件の良否を判断するための活用が期待される。本研究では発芽率と遅延蛍光強度との間に有意な負の相関関係が認められたが、種子の老化程度を評価するための実用的な技術とするには、どの程度、発芽率、あるいは出芽率が低下するまで、遅延蛍光強度との間に相関関係が認められるか、などの今後の検討が必要である。また、種子1粒ずつの遅延蛍光強度を計測することで、その種子の発芽能力を評価できると考えられるが、発芽、あるいは出芽するかどうかの閾値となる遅延蛍光強度を設定するなど、さらなる研究を行う必要がある。

種子の老化に伴い、紫外線励起光照射により遅延蛍光強度は上昇したが、その現象の背景にあるメカニズムは明らかではない。種子が老化すると、発芽能力は低下するが、種子の老化に伴う変化の一つとして脂質が変性することが知られている。例えば、イネの種子を22か月間貯蔵すると、脂肪酸度は150～220%上昇したと報告されている²¹⁾。また、Stewart and Bewley¹⁶⁾は、老化促進処理を行ったダイズ種子の極性脂質中の飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸を定量した結果、不飽和脂肪酸であるオレイン酸、ならびに飽和脂肪酸であるパルミチン酸およびステアリン酸の絶対量は変化しなかったが、不飽和脂肪酸であるリノール酸およびリノレン酸が減少したと報告している。このような不飽和脂肪酸の減少

は遊離基が増加することを示唆しており、遊離基の増加により種子の生体膜の変性はさらに進行すると推察される。

光を照射された物質の電子は、物質が吸収したエネルギーに見合った準位の軌道へと移り、励起状態となる。しかし、励起状態は不安定であるため、すぐに安定な基底状態に戻る。このときに放出される余分なエネルギーが蛍光である²²⁾。八谷ら¹⁰⁾は、紫外線により励起された玄米の蛍光発光に寄与する物質の多くは糠層に局在するが、胚乳部にも存在しているとされている。さらに、蛍光発光には脂溶性成分が大きく関与すると考えられるものの、酸化還元酵素との関連から、単一の化合物ではなく、複数の成分が関与する可能性もあると指摘している。また、金田ら²³⁾は、ビール醸造用の碎米を長期間貯蔵すると、碎米からの化学発光は強まり、発光スペクトルから、その蛍光発光には脂質類の酸化の初期段階で生じる一重項酸素、あるいは励起カルボニルが関与する可能性があるとしている。これらのことから、老化したダイズ種子での紫外線励起光を照射した後の遅延蛍光の強度の上昇には、種子の老化に伴う脂質の変性に由来する物質が関与するものと推察される。今後、種子の老化に伴う蛍光強度の上昇に関与する物質を明らかにすることは、種子の老化過程を解明するためにも重要であると考えられる。

摘 要

ダイズ‘フクユタカ’種子に紫外線励起光を照射し、その後の遅延蛍光強度を、微弱発光計数装置を用いて計測した。1年間、無包装・室内保存した種子では、密封・冷蔵保存した種子に比べ、発芽率および出芽率は低下し、遅延蛍光の強度は高かった。気温30°C、相対湿度95%以上で種子を保存する老化促進処理を行うと、処理期間が長くなるに従い、発芽率は低下し、遅延蛍光強度は高くなった。密封・冷蔵および無包装・室内保存した種子、ならびに老化促進処理を行った種子の発芽率と励起光照射1秒後の遅延蛍光強度との間には有意な負の相関関係が認められ、発芽率の低下に伴って遅延蛍光強度は上昇した。以上の結果から、紫外線励起光を照射した後の遅延蛍光を計測することで、ダイズ種子の老化程度を評価できると考えられた。

謝 辞

本実験を遂行するにあたり、三重大学生物資源学部の梅崎輝尚教授には、供試材料の提供において多大なご協力を頂いた。ここに深く感謝申し上げます。また、本研究は農林水産省プロジェクト研究「新鮮でおいしい『ブランド・ニッポン』農産物提供のための総合研究 6系 野菜」の支援を受

けて遂行した。ここに記して深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 三浦周行. 種子の特性と取扱い. 西 貞夫 監修, 新編 野菜園芸ハンドブック. 養賢堂, 東京. 124-140. 2001.
- 2) 中村俊一郎. 農林種子学総論. 養賢堂, 東京. 1-280. 1985.
- 3) 藤下典之. 種子の発芽. 大阪府立大学農学部園芸学教室編. 園芸学実験・実習. 養賢堂, 東京. 104-106. 1981.
- 4) 農林水産省. 農業を支える基盤リソース-遺伝資源-. 農林水産研究開発レポート. 25: 1-21. 2008.
- 5) 松倉 潮, 金子成延, 門間美千子. カラーゼ呈色による米一粒の鮮度測定法. 日本食品科学工学会誌. 47: 523-528. 2000.
- 6) Steere WC, Levengood WC, Bondie JM. An electronic analyser for evaluating seed germination and vigor. *Seed Sci. Technol.* 9: 567-576. 1981.
- 7) 菰原昌司, 元下信二, 関 圭吾, 齋藤高弘, 志賀 徹, 大谷敏郎. 焙煎ゴマ油の焙煎温度および品質劣化が極微弱発光現象に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌. 50: 303-309. 2003.
- 8) 薄木理一郎. ケミルミネッセンス測定による食用油脂劣化度の判定. 日本食品工業学会誌. 32: 74-81. 1985.
- 9) 山口貴之, 齋藤高弘, 岡本竹己, 佐々木隆浩, 杉江正美, 菰原昌司, 志賀 徹. 化学発光を用いた清酒の熟度・抗酸化能の評価. 日本醸造協会誌. 104: 303-311. 2009.
- 10) 八谷 満, 浅野目謙之, 後藤恒義, 中村 透, 野田崇啓. 紫外線励起蛍光画像法を用いた米の鮮度評価技術-米鮮度評価システムの試作とその適応性-. 農業機械学会誌. 72: 349-358. 2010.
- 11) 菰原昌司, 齋藤高弘, 志賀 徹, 大谷敏郎. 米の極微弱発光現象の画像計測と脂肪酸度の推定. 日本食品科学工学会誌. 49: 719-725. 2002.
- 12) 小浜恵子, 三浦達夫, 藤井雅人. 化学発光による米および発芽玄米の品質劣化計測. 岩手県工業技術センター研究報告. 11: 66-69. 2004.
- 13) 野田博之, 後藤恒義, 大矢博昭, 鎌田 仁. 紫外線励起蛍光画像法を用いた玄米の鮮度評価. 分析化学. 51: 323-326. 2002.
- 14) Saeki R, Miyazawa T, Usa M, Inaba H. Relationship between low-level chemiluminescence and germinability of soybean seeds. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1603-1605. 1990.
- 15) Veselova TV, Veselovsky VA, Kozar VI, Rubin AB. Delayed luminescence of soybean seeds swelling and accelerated aging. *Seed Sci. Technol.* 16: 105-113. 1988.
- 16) Stewart RRC, Bewley JD. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 65: 245-248. 1980.
- 17) Priestley DA, Leopold AC. Lipid changes during natural aging of soybean seeds. *Physiol. Plant.* 59: 467-470. 1983.
- 18) Priestley DA, Leopold AC. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. *Plant Physiol.* 63: 726-729. 1979.
- 19) Priestley DA, McBride MB, Leopold AC. Tocopherol and organic free radical levels in soybean seeds during natural and accelerated aging. *Plant Physiol.* 66: 715-719. 1980.
- 20) Buchvarov P, Gantcheff T. Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds. *Physiol. Plant.* 60: 53-56. 1984.
- 21) Agrawal PK. Germination, fat acidity and leaching of sugars from five cultivars of paddy (*Oryza sativa*) seeds during storage. *Seed Sci. Technol.* 5: 489-498. 1977.
- 22) 大澤善次郎. ケミルミネッセンス化学発光の基礎・応用事例. 丸善, 東京. 1-196. 2003.
- 23) 金田弘拳, 狩野幸信, 越野昌平. 碎米の化学発光. 日本醸造協会誌. 89: 412-413. 1994.