

果樹の樹皮や葉中のタンパク質 代謝の制御が休眠、耐寒性 萌芽に及ぼす影響

(課題番号 02660024)

平成3年度科学研究費補助金(一般研究C)
研究成果報告書

平成5年(1993)3月

研究代表者 松井 弘之
(千葉大学園芸学部)

果樹の樹皮や葉中のタンパク質
代謝の制御が休眠、耐寒性
萌芽に及ぼす影響

平成3年度科学研究費補助金

一般研究(C)成果報告書

1. 課題番号

02660024

2. 研究課題

果樹の樹皮や葉中のタンパク質代謝の制御が休眠、耐寒性、萌芽に及ぼす影響

3. 研究代表者

松井弘之(千葉大学園芸学部・助教授)

4. 研究分担者

小原 均(千葉大学園芸学部・助手)

5. 研究経費

平成2年度 2,000千円

平成3年度 400千円

6. 研究発表

- 1) 智方裕香、中山真義、山根久和、室伏 旭、高橋信孝、小原 均、松井弘之、平田尚美、1991. ニホンナシ新梢における内生(GA)の同定. 園学雑、第60巻別冊1: 94-95.

果樹の樹皮や葉中のタンパク質 代謝の制御が休眠、耐寒性 萌芽にぼす影響

序

平成3年度より果実の完全自由化が実施され、今後多くの果実や果汁が、各国から輸入されることになる。これに対抗するには、高品質果実の生産、新品種の育成、促成栽培や周年栽培といった果樹栽培方式の多様化などが必要と考えられる。特に、促成栽培や周年栽培といった栽培様式は、わが国独特の方法であり、今後ますますの発展が期待される。しかし、これらは従来と全く異なった栽培様式のため、生理学的な立場から早急に解決せねばならない多くの問題点が残されている。

そこで、本研究では、わが国の代表的な落葉性果樹であるリンゴ、ニホンナシ、ウメ、蔓性果樹のブドウ、常緑性果樹のカンキツを材料として、萌芽、開花、新梢伸長、花芽分化、休眠などの果樹の生長周期といった実際栽培にとって、最も基本的な点に焦点を当て、タンパク質代謝と言う新しい局面に植物ホルモンの研究で得られた知見を加味し、これらの現象との関係を明らかにし、果樹栽培に関わる諸問題解決の一助にしようとして試みたものである。もとより、この種の研究は長い年月を要するものであり、文部省より助成を頂いた2年間では当初計画したほど十分な成果を上げるに至らなかった。しかし、その一端が解明できたことは、この文部省科学研究費に負うところが極めて大であり、深く感謝の意を表する。なお、今後も引き続き本研究を継続していくつもりであるが、ここに2年間の成果をとりまとめて報告する次第である。

平成5年3月

研究代表者 千葉大学園芸学部・助教授
松井弘之

目 次

第1章 果樹の生長周期と樹体内のタンパク質代謝及び植物生長調節物質との関係	1
はじめに	1
第1節 樹皮や葉中のタンパク質及びアミノ酸含量の変化	1
(1) リンゴ	1
(2) ブドウ	2
(3) カンキツ	4
(4) ウ メ	4
第2節 萌芽期の温度と樹皮中のタンパク質及びアミノ酸含量	5
第3節 萌芽期のタンパク質及びアミノ酸含量と植物生長調節物質	6
(1) リンゴ	6
(2) ニホンナシ	9
(3) ウ メ	10
まとめ	11
引用文献	13

第2章 ニホンナシの花芽分化と内生植物生長調節物質（特にジベレリン）との関係	14
はじめに	14
第1節 新梢の誘引及び植物生長抑制剤処理が新梢伸長及び花芽着生に及ぼす影響	15
第2章 新梢における内生GAの同定	15
第3章 新梢の誘引及び植物生長抑制剤処理が新梢中のGA ₁₉ 含量の変化に及ぼす影響	29
第4章 新梢の誘引処理が新梢中のABA及びIAA含量に及ぼす影響	30
まとめ	32
引用文献	33

第1章 果樹の生長周期とタンパク質代謝及び植物生長調節物質との関係

松井弘之

はじめに

窒素代謝の研究は、今日まで肥料との関係において多くの研究がなされてきた。しかし、タンパク質やその構成成分であるアミノ酸と果樹の生長周期との関係についての報告はほとんどなされていない。しかし、これらが明らかにされれば、果樹の生長周期を人為的に制御することが可能となり、栽培様式が多様化しつつあるわが国の果樹栽培にとって極めて有効と考えられる。

リンゴ樹では、春から夏にかけて葉中に多量のタンパク質を蓄積し、外気温が低下し始めると、それまで葉に蓄積されていたタンパク質が、急速にアミノ酸に分解され、アスパラギン酸やグルタミン酸の形態で枝梢内（樹皮）に転流し、そこで再びタンパク質が合成・貯蔵される。この貯蔵タンパク質は、翌年春先、温度の上昇に伴って、再びアミノ酸に分解され、萌芽、開花やその後の新梢の生長に利用される。Titus (1981) は、この一連のタンパク質の動きから「Nitrogen Recycling」説を提唱した。さらに、KangやTitusら (1982) はこれらの現象を酵素学的に証明してきた。しかしながら、彼らは植物ホルモンや糖代謝との関連については明らかにしていない。

本研究では、わが国の代表的な落葉性果樹であるニホンナシ（幸水）、ウメ（白加賀）、つる性果樹であるブドウ（デラウェア）及び常緑性果樹であるカンキツ（杉山系普通ウンシュウ）を実験材料に用い、先ず、これらの果樹においてもリンゴ（ゴールドデン・デリシャス）と同様な変化が起こるかどうかを比較するために、樹皮や葉中のタンパク質やアミノ酸含量の季節的变化を調べ、萌芽、開花、新梢伸長、花芽分化、休眠などの生長周期との関連についても検討した。また、樹体内におけるタンパク質代謝に、植物生長調節物質や温度がどのようにかかわっているかについても調査した。

第1節 樹皮や葉中のタンパク質及びアミノ酸含量の変化

(1) リンゴ

冬季の2年生枝の樹皮中に貯蔵されているタンパク質含量は、約8mg/g fw.

であるが、3月中旬頃より分解が始まり、4月下旬には約3 mg/g fw.に減少した。この年の萌芽は4月中旬であり、その直後の新葉及び新梢樹皮中のタンパク質含量は、それぞれ約8 mg/g fw.、7 mg/g fw.と高く、その後新梢の伸長に伴い減少し、7月中旬には両者とも約3 mg/g fw.と年間で最も低くなった。その後、いずれも緩やかに増加するが、10月初旬頃より急速な蓄積が起こった。ただし、葉では落葉前、すなわち11月初旬頃より落葉まで、やや減少するのが観察された(第1図-A)。

一方、樹皮中のアミノ酸含量はタンパク質の分解に伴い急増したが、萌芽が始まると急減した。この一連の変化は、貯蔵されていたタンパク質がアミノ酸に分解され、このアミノ酸が萌芽に際して利用されていることを示している。萌芽当初の新葉や新梢樹皮中のアミノ酸含量は、約4 mg/g fw.であったが、6月下旬にかけてタンパク質の変化と同様に減少し、その後はほぼ一定で推移した。ただし、葉や樹皮中のタンパク質含量が増加する10月初旬頃より樹皮中のアミノ酸含量は増加するものの、落葉前になると急減した(第1図-A)。

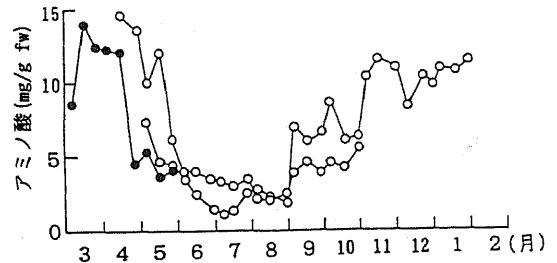
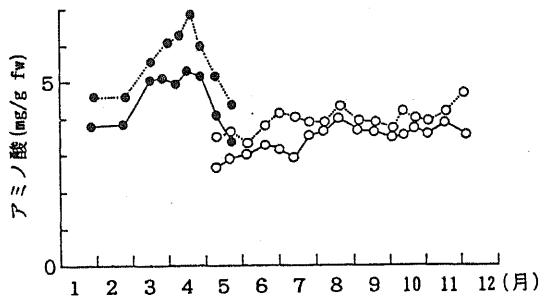
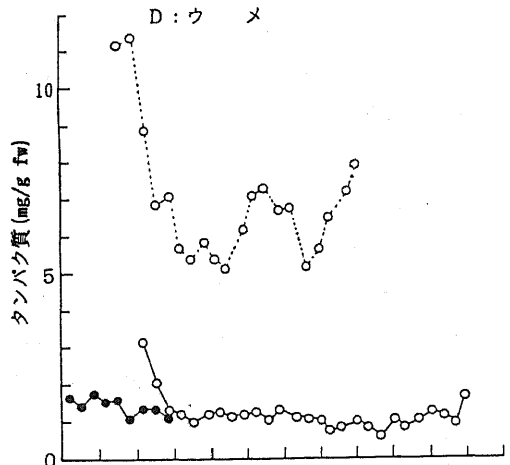
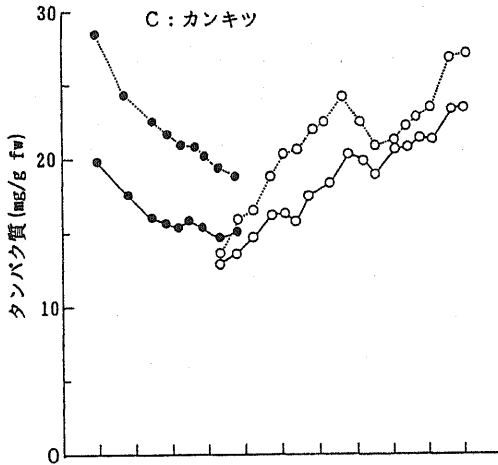
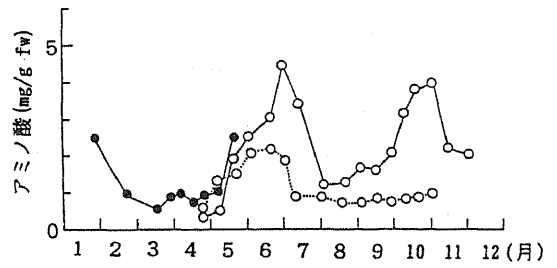
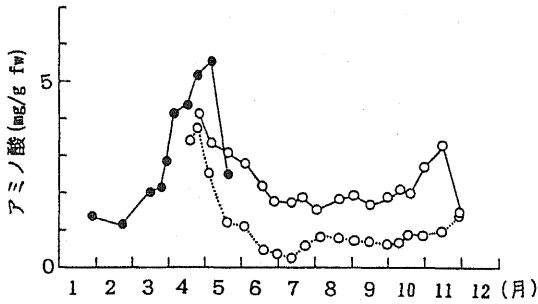
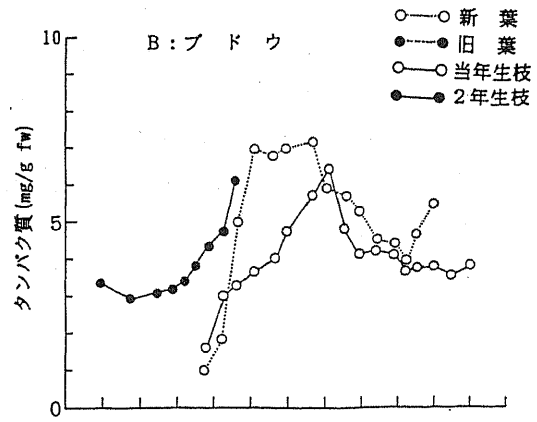
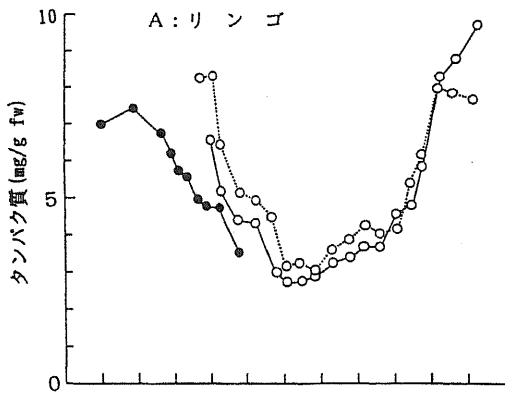
以上の結果は、Kangら(1980)が米国イリノイ州で調査した結果とほぼ一致している。ただし、わが国における調査では、落葉前に葉中で起こるタンパク質の分解はそれほど多くはなかった。この差は秋季の気温の変化、すなわち、わが国では緩やかに気温が低下するが、彼らが調査したイリノイ州(アーバナ・シャンペーン)では、9月下旬頃から急激に温度が低下することから、これが原因しているのかもしれない。

(2) ブドウ

休眠期の2年生枝の樹皮中のタンパク質含量は約3 mg/g fw.であるが、根の活動が開始される3月中旬頃より増加した。また、萌芽後の新葉では成葉に達する6月上旬まで急激に増加し、7月下旬まで約7 mg/g fw.の高濃度を維持した。その後10月上旬にかけて減少し、落葉が始まる時期になると、再び増加した。ところが、新梢では、その伸長が停止する8月上旬までしだいに増加し、その後は減少した(第1図-B)。

他方、葉や新梢の樹皮中のアミノ酸含量は、タンパク質含量の変化とよく類似していた。すなわち、2年生枝の樹皮中では、2月から3月にかけて約1 mg/gfw.で、ほぼ一定であり、萌芽後の新梢の樹皮中のアミノ酸含量は6月下旬と10月中旬にピーク(約4.5 と 4 mg/g fw.)を示した。葉中のアミノ酸含量は5月から6月にかけてやや増加するものの、量的には少なく、7月から落葉するまで約1 mg/g fw.とほぼ一定で推移した(第1図-B)。

ブドウの場合、タンパク質含量の変化は、リンゴのそれと全く逆の変化を示



第1図. 果樹の新梢及び2年生枝中のタンパク質、アミノ酸含量の季節的变化

し、前年度中に枝の樹皮に蓄積されたタンパク質が萌芽時に減少せず、逆に増加した。また、根の中のタンパク質含量を休眠期と萌芽時と比較しても変化が見られず、このことは樹体に蓄積されたタンパク質が、萌芽後の新梢の生長に直接関連していないのかもしれない。ただし、萌芽や新梢の生長には、かならずタンパク質やアミノ酸が必要であることから、これらの物質は樹体が必要とする時に直接生合成されるのかもしれない。

(3) カンキツ

カンキツの葉や樹皮中のタンパク質含量は、リンゴやブドウと異なり、3～4倍多く含まれているのが特徴であった。旧葉や2年生枝の樹皮中のタンパク質含量は、2月初旬頃より萌芽、開花期にかけて、枝では約10mg/g fw.、旧葉では約5 mg/g fw.減少した。しかし、新葉や新梢の樹皮中では、萌芽期から12月頃までほぼ一定割合で増加し続けた(第1図-C)。

一方、旧葉や2年生枝の樹皮中のアミノ酸含量は、4月中旬頃まで増加が続き、萌芽が始まると減少した。しかし、新葉や新梢の樹皮中では12月まで顕著な変化が認められなかった(第1図-C)。

以上の結果は、カンキツもリンゴの場合と同様に、枝の樹皮中に蓄積されたタンパク質が春先にアミノ酸に分解され、萌芽後の新梢の伸長や開花に利用されることを示している。また、常緑果樹であるカンキツでは、葉もタンパク質の貯蔵器官であり、枝と同様に春先の窒素化合物の供給源となっている。

(4) ウメ

ウメの2年生枝や新梢の樹皮中のタンパク質含量は、一年間を通過して1～2mg/g fw.であり、大きな変化が見られなかった。ところが、葉中では萌芽時約11.5mg/g fw.であったが、その後7月中旬にかけて急減し、約5mg/g fw.となった。しかし、最も高温となる7月下旬から8月下旬にかけて約7mg/g fw.まで増加するが、その後再び約5mg/g fw.に減少した。ところが、外気温が低下し始めると増加し、落葉期には約8mg/g fw.となった(第1図-D)。

一方、2年生枝中のアミノ酸含量は、開花始めより満開期にかけて約14mg/g fw.に急上昇した。その後は減少し、5月下旬には約4mg/g fw.と10mg/g fw.少なくなった。新梢中のアミノ酸含量は、萌芽期から7月まで減少を続け、約1mg/g fw.となったものの、その後は次第に増加し、冬季には約13mg/g fw.となった。また、葉中のアミノ酸含量も萌芽直後から減少し始め、約15mg/g fw.であったものが8月下旬には約2mg/g fw.まで減少した。その後は新梢の場合と同様に緩やかに増加し、落葉時には約6mg/g fw.となった(第1図-D)。

以上のように、ウメの葉中のタンパク質含量はリンゴとよく似た変化を示したが、樹皮中では他の果樹のような季節的变化を示さなかった。なお、冬季から開花期にかけて、根中のタンパク質含量を調査したが、その間3.3 ~ 3.8 mg/g fw.で、ほとんど変化を示さなかった（第1表）。このことは、ウメの開花や萌芽に際して、2年生枝の樹皮や根に蓄積されたタンパク質が利用されないことを示している。ただし、アミノ酸含量はやや減少した。

第1表. ウメの根中のタンパク質及びアミノ酸含量の変化

	12月17日	1月9日	1月30日
		mg/g fw	
タンパク質	3.55	3.33	3.75
アミノ酸	19.12	19.12	16.18

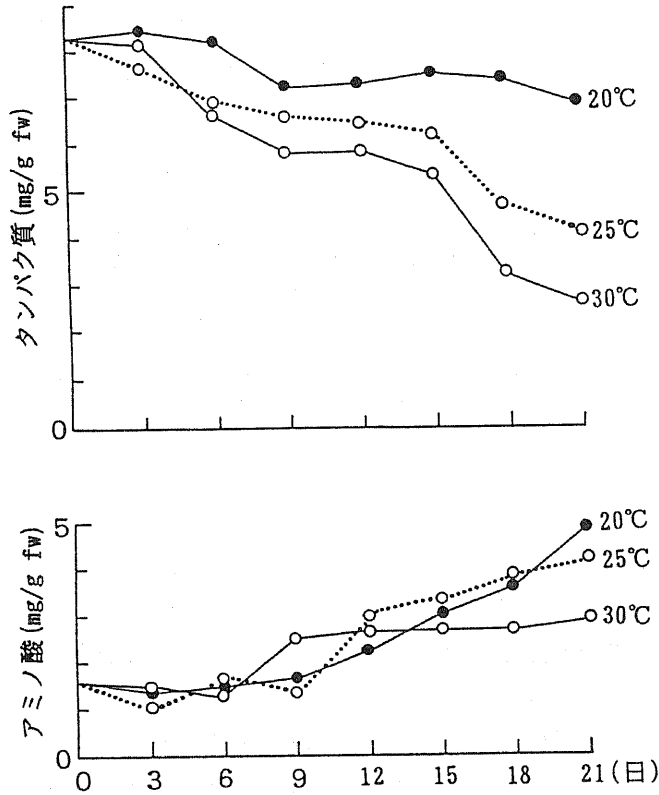
第2節 萌芽期の温度と樹皮中のタンパク質及びアミノ酸含量

リンゴでは、2年生枝の樹皮中に貯蔵されていたタンパク質が、萌芽時にアミノ酸に分解され、開花や新梢生長に利用されることが明らかとなった。そこで、他発的休眠期にあたるリンゴの切り枝を用いて、萌芽期の温度が樹皮中のタンパク質の分解に、どのように影響するかについて調査した。

20℃区では、実験開始時約8.3mg/g fw.であったタンパク質含量は、加温21日後でも約7mg/g fw.であり、約16%分解されたにすぎない。しかし、25℃区や30℃区では、加温3日後には、既にタンパク質の分解が認められ、加温21日後、25℃区では約50%が、30℃区では66%が分解された（第2図）。

一方、実験開始時の樹皮中のアミノ酸含量は約1.6mg/g fw.であったが、いずれの温度区でも増加し、加温21日後、20℃区、25℃区、30℃区ではそれぞれ約4.8、4.2、2.8mg/g fw.となった。ところが、25℃区や30℃区ではかなりのタンパク質が分解されたにもかかわらず、20℃区よりも25℃区や30℃区の方がアミノ酸含量が少なくなっていた。特に、30℃区では加温開始9日以後ほとんど増加が認められなかった。これは、高温ほど萌芽が早くなり、また新梢の伸長が促進されることから、それらの発育のためにアミノ酸が利用されてい

考えられる (第2図)。



第2図. 萌芽時の温度がリンゴの2年生枝中のタンパク質、アミノ酸含量に及ぼす影響

第3節 萌芽期のタンパク質及びアミノ酸含量と植物生長調節物質

(1) リンゴ

一般に、萌芽時芽で形成された植物ホルモンが、その後の新梢生長に関連していると考えられている。そこで、萌芽時に外生的に処理した植物生長調節物質が、樹皮中のタンパク質やアミノ酸含量にどのように関連しているのかを明らかにしようとした。他発的休眠期にあるリンゴの切り枝を用い、まず切り枝上の全ての芽を切除し、植物ホルモンの合成場所をなくした後、植物生長調節

物質を処理し、30℃の恒温室で15日間挿し木培養し、5日間隔で樹皮中のタンパク質やアミノ酸含量の変化を調査した。なお、今回の実験に用いた植物生長調節物質は第2表に示した。

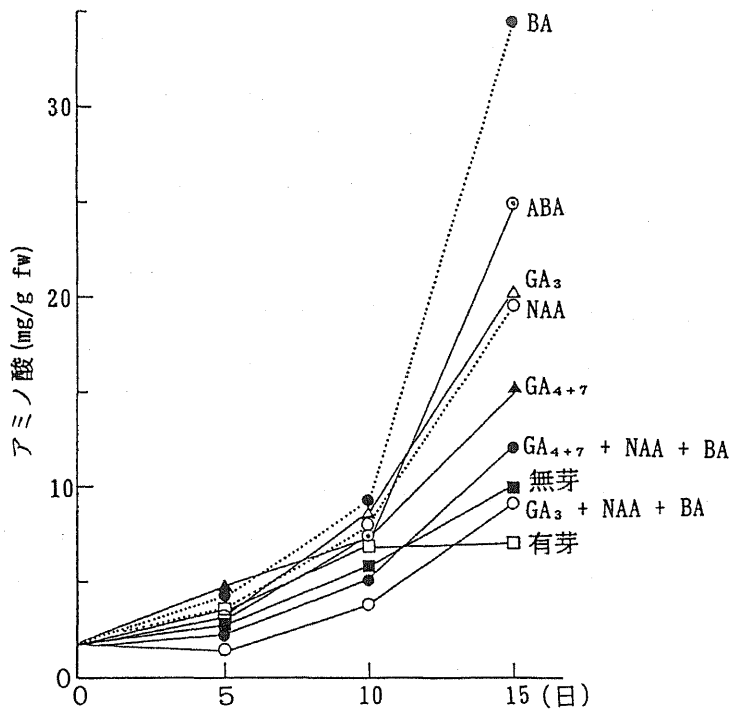
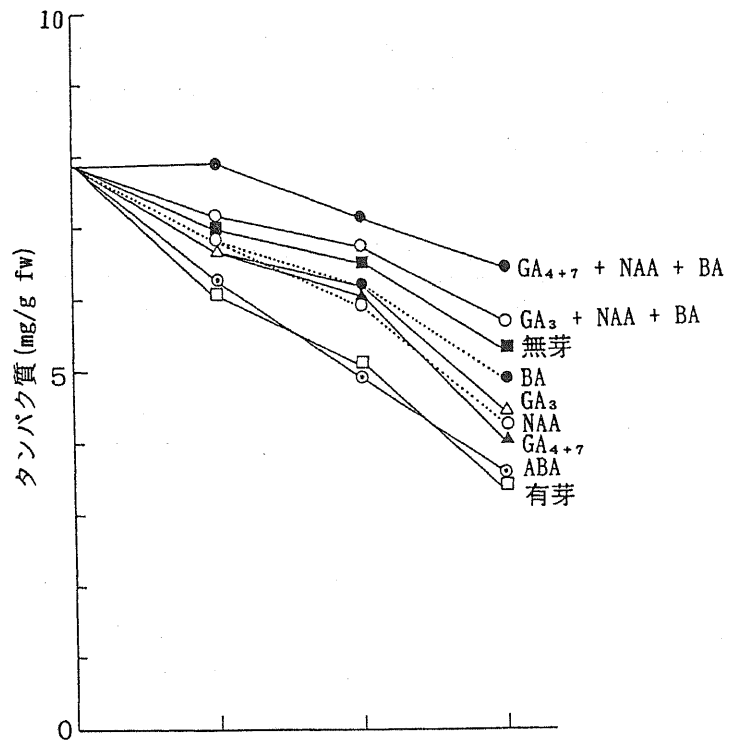
第2表. 実験に用いた植物生長調節物質の種類と濃度

GA ₃	: Gibberellic acid A ₃	1,000ppm
GA ₄₊₇	: Gibberellic acid A ₄₊₇	1,000ppm
BA	: 6-Benzylamino purine	50ppm
NAA	: Naphthaleneacetic acid	50ppm
ABA	: Absciscic acid	1,000ppm

有芽区（無処理区）の樹皮中では、実験開始時に約8mg/g fw.あったタンパク質は、15日後には約3mg/g fw.となり、15日間で約5mg/g fw.が分解されたが、無芽区の樹皮中では、約2.5mg/g fw.しか分解されなかった。ところが、GA₄₊₇+NAA+BAやGA₃+NAA+BAを処理すると、タンパク質の分解がさらに抑制され、わずか1.5～2mg/g fw.であった。いずれの処理も有芽区よりタンパク質の分解が促進された区は認められなかったが、無芽区よりタンパク質の分解が促進されたのは、ABA、BA、GA₃、NAA、GA₄₊₇処理区であった。特に、ABA処理区は有芽区とほとんど差異が認められなかった（第3図）。

一方、アミノ酸含量に及ぼす植物生長調節物質の影響について見ると、実験開始時のアミノ酸含量は約4mg/g fw.であったが、15日後の有芽区では約7mg/g fw.、無芽区では10mg/g fw.に増加した。GA₃+NAA+BA処理区では無芽区とほとんど差異は認められなかったが、GA₄₊₇+NAA+BAやGA₄₊₇処理区では、それぞれ約12mg/g fw.、15mg/g fw.に増加した。さらに、GA₃やNAA処理区では約20mg/gfw.に、ABA処理区では約25mg/g fw.に、BA処理区では約35mg/g fw.にも増加した（第3図）。

以上の結果は、ABA、GA₄₊₇、NAA、GA₃処理などは、無芽でも有芽と同じ様にタンパク質の分解を促進し、さらにGA₄₊₇+NAA+BAやGA₃+NAA+BA処理は無芽よりもタンパク質の分解を強く抑制したことは、萌芽時に芽で合成された内生植物ホルモンがタンパク質代謝に関連していることがうかがわれる。また、無芽にもかかわらずタンパク質の分解を促進したABA、GA₄₊₇、NAA、GA₃処理区ではアミノ酸の含量を増加させ、特にBA処理区では無芽区の2.5倍に増加したことは、有芽であれば新梢生長のために利用されるが、無芽のため樹皮中に蓄積されたものと考えられる。

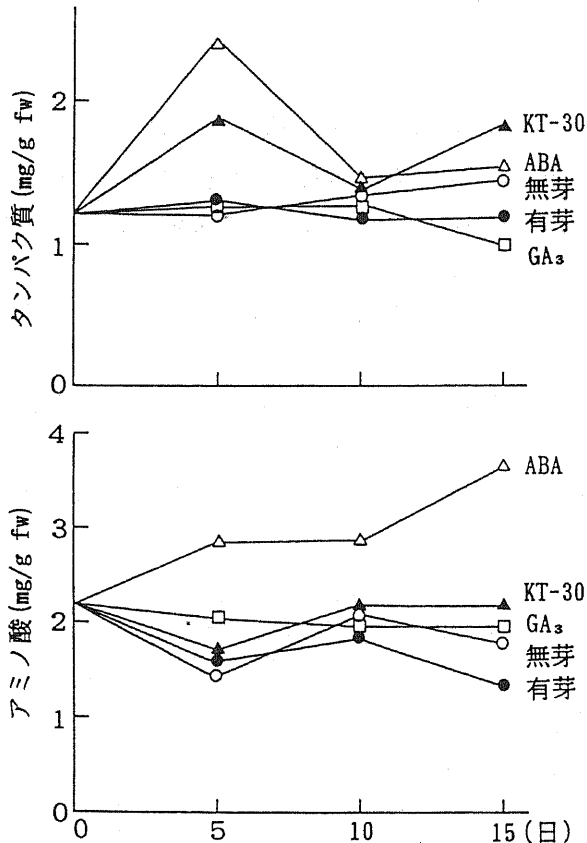


第3図. 植物生長調節物質が萌芽時のリンゴの2年生枝中のタンパク質、アミノ酸含量に及ぼす影響

(2) ニホンナシ

ニホンナシ '幸水' から 1 m 前後の休眠枝 (徒長枝) を採取し、基部から 40 cm 程度の切り枝とし、リンゴの場合と同様に、枝上の全ての芽を切除 (無芽区) した後、25°C 恒温室で GA_3 、ABA、KT-30 の溶液 (各 10 ppm) 中で挿し木培養し、5 間隔で 15 日目まで樹皮中のタンパク質及びアミノ酸含量の変化を測定した。なお、KT-30 [1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea] は尿素系の合成サイトカイニンである。

実験開始時の樹皮中のタンパク質含量は、リンゴ、ブドウ、カンキツに比較して極めて少なく、1.2 mg/g fw. であり、有芽区では処理 15 日後でもほとんど変化が見られなかった。しかし、無芽区でははしだいに増加し、15 日後には 1.44 mg/g fw. となった。ところが、ABA 処理区では、急激にタンパク質含量が増加



第4図. 植物生長調節物質が萌芽時のニホンナシの2年生枝中のタンパク質、アミノ酸含量に及ぼす影響

し、5日後には約2倍に達したが、10、15日後にはやや減少し、約20%の増加にとどまった。また、KT-30 区の15日後では約60%の増加を示し、GA₃ 処理区では約20%減少した（第4図）。

有芽区におけるアミノ酸含量はしだいに減少し、5日後には約40%減となった。ところが、無芽区の減少量は約20%であったことから、アミノ酸は萌芽のために利用されたものと考えられる。なお、KT-30 やGA₃ 処理区では、若干の減少が認められたが、ABA 処理区では約60%の増加を示した（第4図）。

このように、ニホンナシにおいてもリンゴと同様に、植物生長調節物質処理がタンパク質の分解やアミノ酸含量に影響を及ぼすことから、萌芽時にこれらの物質が関与していると考えられる。特に、ABA 処理区では樹皮中のタンパク質とアミノ酸含量を増加させた。このことは、ABA がまずアミノ酸の生合成を促進し、それに平行してタンパク質が合成されたと考えられる。この現象は休眠の導入期に類似している。

(3) ウメ

他発的休眠状態にある30~40cmの2年生枝を採取し、第2表に示した植物生長調節物質を散布処理し、18℃の恒温室で18日間培養後、樹皮中のタンパク質及びアミノ酸含量の変化を調査した。なお、本実験に用いた植物生長調節物質の種類と濃度は第3表に示した。

ウメの樹皮中のタンパク質含量は、GA₃ やBA処理区でほとんど変化を示さなかった。またNAA や ABA処理区でも若干減少しただけであった。しかし、アミノ酸含量は無処理区で、実験開始時の約2倍になったが、GA₃ やNAA 処理区では、増加率はやや低く、BAやABA 処理区では40~50%しか増加しなかった（第3表）。このようにウメでは、第1図-Dに示したように、樹皮中のタンパク

第3表. ウメの樹皮中のタンパク質及びアミノ酸含量に及ぼす植物生長調節物質の影響

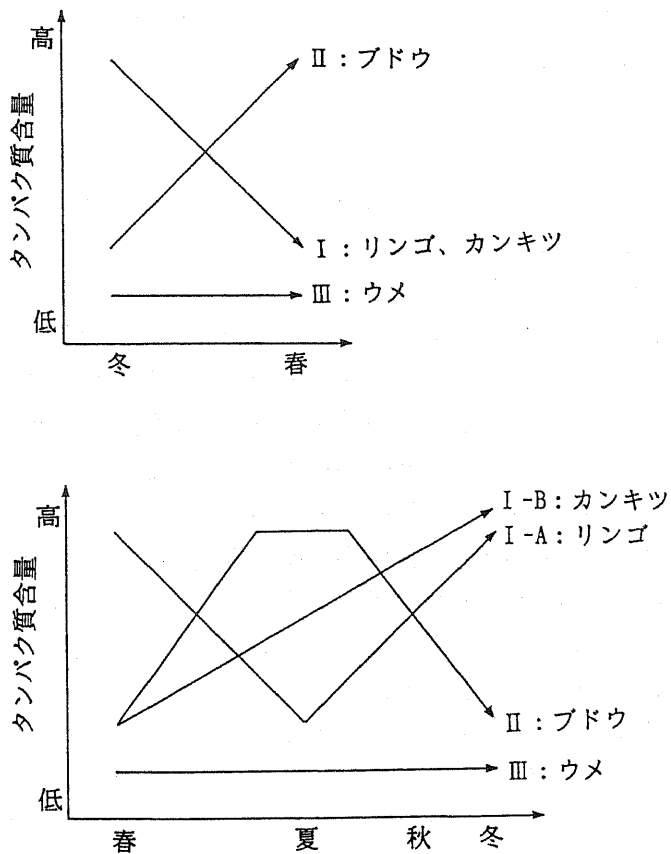
	タンパク質	アミノ酸
無処理	110	212
GA ₃ 1000ppm	112	170
NAA 50ppm	83	188
BA 50ppm	103	140
ABA 1000ppm	84	147

それぞれの含量は採取日の値を100とした場合の培養18日後の比数

質含量が低く、また季節的な変化が起こらないことから、内生のホルモンはタンパク質代謝に関与していないように思われるが、アミノ酸含量が急激に変化することから、アミノ酸代謝には関連していると推察される。

まとめ

2年生枝の樹皮あるいは新梢の葉や樹皮中のタンパク質含量は、果樹の種類や時期によって著しく異なっていることが明らかとなった。すなわち、休眠期から開花、萌芽期にかけての樹皮中のタンパク質含量の変化を見ると、リンゴやカンキツのように、急激に減少するタイプと、ブドウのように、逆に増加するタイプと、ウメのように全く変化を示さない3タイプ（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ）に区別



第5図. 果樹の新梢及び2年生枝中のタンパク質含量の季節的变化の模式図

された。さらに、萌芽期から休眠期までの新梢樹皮中のタンパク質含量の変化を見ると、リンゴのように新梢の生長に伴って減少し、夏季に最も低含量となるが、その後休眠期にかけて増加するタイプと、リンゴと全く逆の変化を示すブドウと、カンキツのように萌芽期から夏季、休眠期にかけて一定の割合で増加していくタイプと、ウメのように一年中増減を示さない4タイプ（I-A、I-B、II、III）に区別された。これらを模式図に示すと第5図のとおりである。なお、新梢の葉中のタンパク質含量の変化は、いずれの果樹も樹皮中の変化に類似していた。しかし、ウメでは極めて異質であり、樹皮中では年間を通して常にほぼ一定であったが、葉中では大きな動きを示し、リンゴと似た変化を示した。これらのことから、リンゴやカンキツのようなIのタイプでは、前年度樹体に貯蔵されたタンパク質が開花、萌芽、新梢の初期生長に利用されることを意味している。ところが、ブドウやウメのようなIIやIIIのタイプでは、開花、萌芽、新梢の初期生長に必要なタンパク質は、2年生枝の樹皮や根から供給を受けるのではなく、根より吸収した無機窒素と根や枝に蓄積されていた炭水化物とからまずアミノ酸が生合成され、それらより生合成されると考えられる。

一般に、細胞分裂や肥大が盛んな組織や器官、すなわち新梢の生長点、根の先端、幼果、未熟種子では内生植物ホルモンのレベルが高く、そこでは物質代謝が活発であり、sink activity が高いことが知られている（松井、1989）。また、萌芽やその後の新梢生長は、根から送られてきた植物ホルモンや芽で生合成された植物ホルモンが関与し（Went 1938, Skene 1967, Coombe 1970）、貯蔵されていたデンプンや糖を利用して起こると考えられている（Winkler 1945, 岡本 1979）。しかし、萌芽時のタンパク質代謝と植物生長調節物質との関係についての報告はほとんど認められない。ところが、根からの植物ホルモンの転流を防ぐため切り枝とし、さらに植物ホルモンの生合成場所である芽を切除し、外生的に各種植物生長調節物質を処理し、樹皮中のタンパク質代謝について比較してみると、有芽の場合と同等にタンパク質の分解を促進したり、逆に無芽の場合よりタンパク質の分解を抑制する植物生長調節物質が認められた。これらの作用は、果樹の種類によって異なるが、いずれも萌芽時のタンパク質代謝に内生の植物ホルモンが関連している可能性を示唆している。

しかしながら、今日まで果樹の樹体内の主要内生植物ホルモンの同定はほとんどなされていない。したがって、本実験で用いた植物生長調節物質は、あくまで代用品であり、タンパク質代謝と内生植物ホルモンとの関連を論ずるためには、まず樹体内の各器官の内生植物ホルモンの種類とレベルを明らかにすることが重要である。

引用文献

- 1). Coombe, G.B. 1970. Fruit set in grape vine : The mechanism of the CCC effect. J. hort. Sci. 45:415-425.
- 2). Kang, S.M. and Titus, J.S. 1980. Qualitative and quantitative changes in nitrogenous compounds in senescing leaf and bark tissues of the apple. Physiol. Plant. 50:285-290.
- 3). 松井弘之. 1989. 光合成産物の生産と分配、「果樹の物質生産と収量」農文協. 25-81.
- 4). 岡本五郎. 1979. ブドウ樹が秋に同化した¹⁴C-物質の翌春における体内分布と移行. 園芸学研究集録. 9:6-12.
- 5). Skene, K.G.M. 1967. Gibberellin-like substances in root exudate of Vitis vinifera. Planta 74:250-262.
- 6). Titus, J.S. and S.M.Kang. 1982. Nitrogen metabolism, translocation and recycling in apple tree. Hort. Rev. 4:204-246.
- 7). Titus, J.S. 1981. Nitrogen recycling in the apple. J. Korean Soc. Hort. Sci. 22(S):11-18.
- 8). Went, F.W. 1938. Specific factors other than auxin affecting growth and root formation. Plant Physiol. 13:55-80
- 9). Winkler, A.J. and W.O.Williams. 1945. Starch and sugar of Vitis vinifera. Plant Physiol. 20:412-432.

第2章 ニホンナシの花芽形成と内生植物生長調節物質（特にジベルリン）との関連

小原 均

はじめに

多年生木本植物である果樹にとっても他の植物と同様に花芽形成や休眠は子孫の繁栄と生命の維持にとって意義深いものである。中川⁸⁾は花芽形成を論ずるにあたり、内生植物生長調節物質は微量でしかも重要な要因であるが、なおかつ、炭水化物やチッ素は開花に対する代謝の予備あるいは基質であると考えられることは無視できないと述べている。これに関して、核酸及びタンパク質合成が内生植物生長調節物質の生理作用に関与していることが明らかになっている¹¹⁾。果樹でも核酸関連物質の処理がオリーブの花数の増加とともに RNAとタンパク合成を促進したという報告⁴⁾や、種々の植物生長調節物質処理がリンゴ切り枝の樹皮中の萌芽期のタンパク質の分解に関与しているように推察されるという報告⁶⁾がある。一方、花成誘導には内生促進物質と抑制物質のバランスが必要であると考えられており¹²⁾、自発休眠の完了にもそれらの微妙なバランスが関与しているという仮説を支持しようという報告^{9, 10)}がある。それゆえ、果樹の枝及び葉中のタンパク質の合成及び代謝に対して内生植物生長調節物質がどのように関与しているかを解明できれば、花芽分化（形成）、休眠の誘導、休眠の期間や深さ、休眠解除や萌芽時期の制御などを人為的に行うことができ、実際栽培への新技術としての利用が期待される。

本研究では、それらの基礎資料を得る目的で、花芽分化時期前後の花芽形成が困難といわれるニホンナシ‘幸水’の新梢全体及び花芽が着生しやすい‘長十郎’の新梢上半部を用いて、品種間、誘引の有無及び植物生長抑制剤（B-9 4000ppm 及び Paclobutrazol 250ppm）処理と内生ジベルリン（以下、GA）との関連を調査するため、新梢（枝）における内生GAの同定を行い、処理によるその後の含量の変化も比較した。なお、‘幸水’の新梢の誘引は6月下旬に行い、植物生長抑制剤処理は新梢全体に行って、B-9 処理は6月上旬の1回、Paclobutrazol 処理は6

月上旬及び下旬に行った。また、新梢の採取は6月下旬、8月上旬及び9月上旬とした。

第1節 新梢の誘引及び植物生長抑制剤処理が新梢伸長及び花芽着生に及ぼす影響

新梢の誘引及び植物生長抑制剤処理が‘幸水’の新梢伸長と花芽着生に及ぼす影響をみるため、落葉後（12月）に各処理による新梢長、節間長及び花芽着生率を調査した（第1表）。

第1表 新梢の誘引及び植物生長抑制剤処理が‘幸水’の新梢伸長と花芽着生に及ぼす影響

品 種	処理区	新梢長 (cm)	節間長 (cm)	花芽着生率 ²⁾ (%)
‘幸 水’	直 立	90.8	4.08	36.9
	誘 引	67.7	4.64	69.8
	B-9	75.3	4.20	75.9
	Paclobutrazol	70.6	4.17	64.8
‘長十郎’	直 立	65.6	4.13	66.4

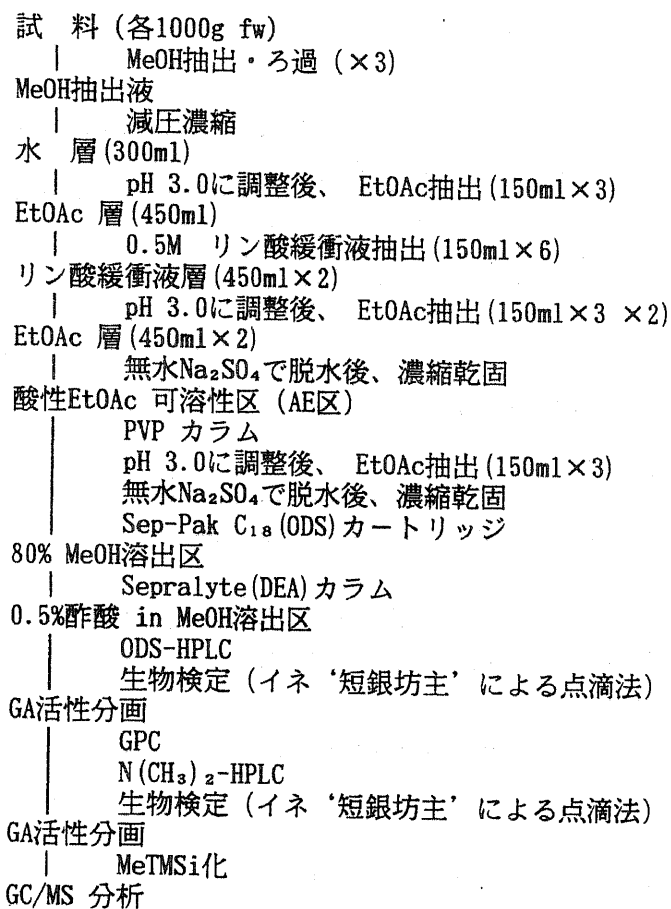
²⁾ 総芽数（花芽+葉芽）に対する花芽数の割合。

‘幸水’直立枝に比べて、誘引及び植物生長抑制剤処理を行った新梢では伸長がかなり抑制され、花芽着生率も、‘幸水’直立枝では約37%であったのに対して、それぞれの処理により約65～76%と著しく花芽着生が促進され、‘長十郎’直立枝とほとんど変わらない値となった。

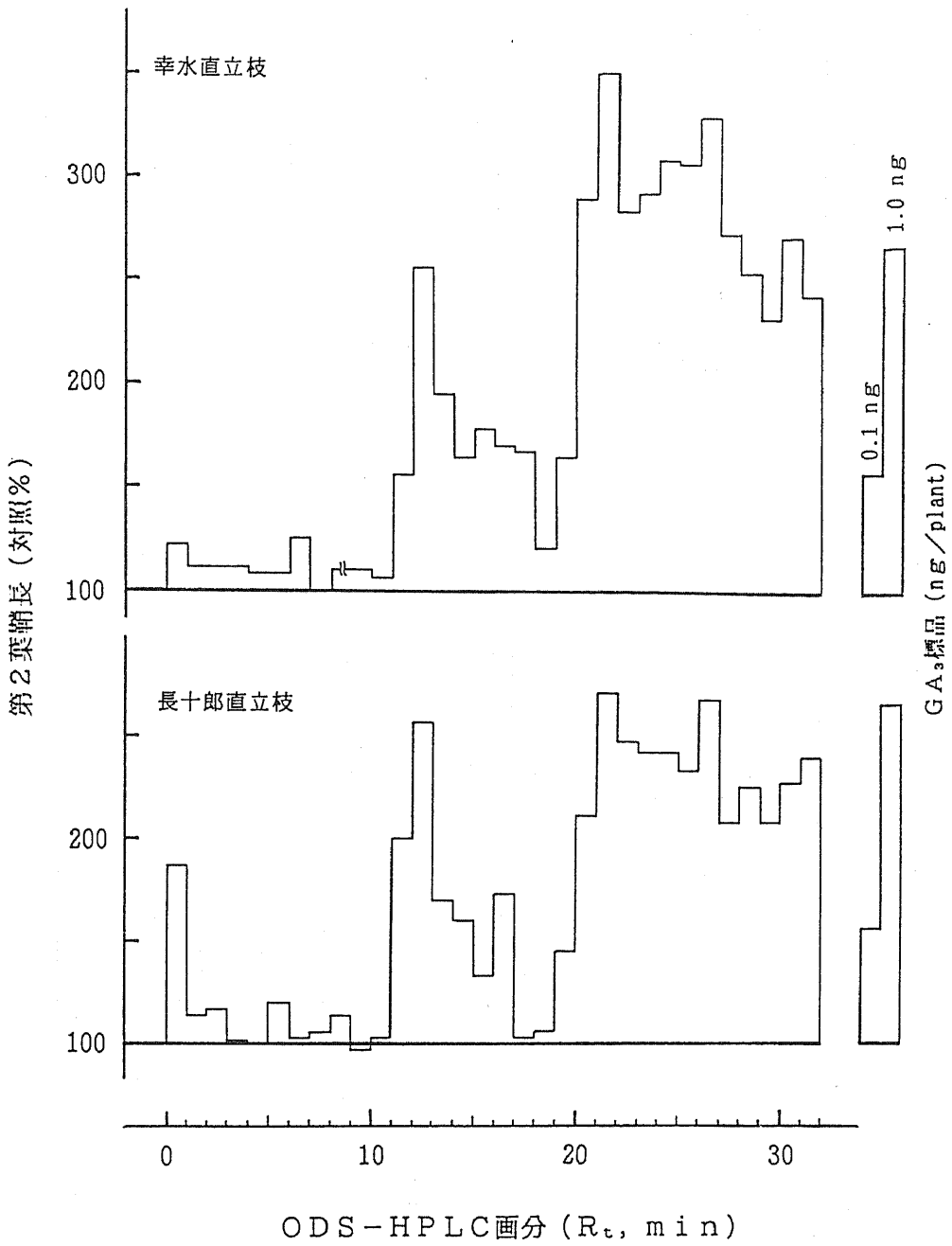
第2節 新梢における内生GAの同定

果樹において内生GAを同定した報告は、ニホンナシ未熟種子中のGA₄⁷⁾、セイヨウナシ未熟種子中のGA₁₇、₂₅、₄₅⁵⁾、モモ¹³⁾、アンズ²⁾及び酸果オウトウ¹⁾未熟種子中のGA₃₂、ピワ未熟種子及び果肉中のGA₉、₁₅、₂₄、₃₅、₅₀、₈₀、₈₄¹⁴⁾、ウンシュウミカン幼果中のGA₁、₄、₉、₁₉、₂₀、₂₄、₂₅、₄₄、₅₃³⁾ などがあるが、それらはほとんどが未熟種子及び幼果を

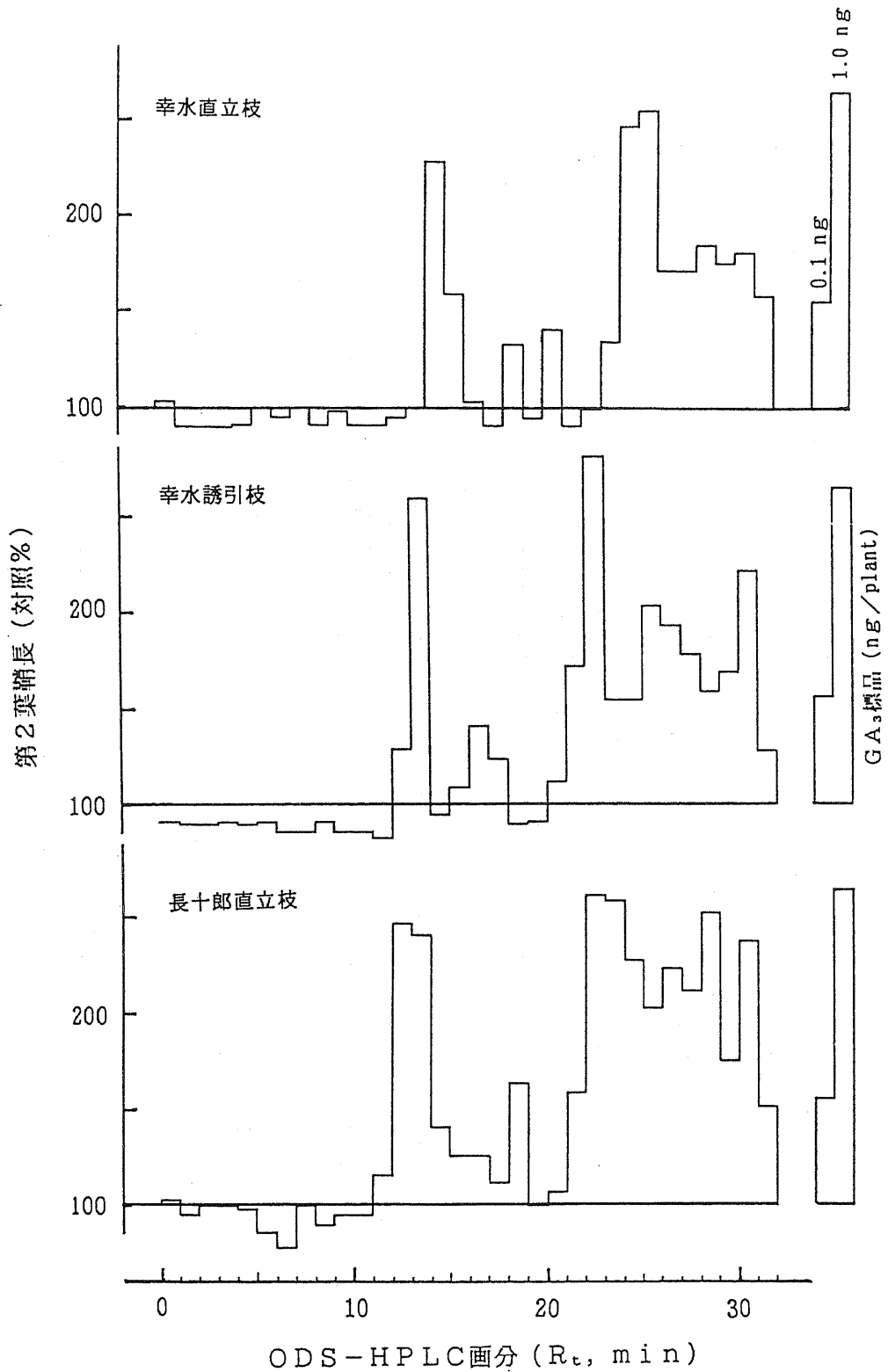
材料として用いたものであり、枝梢中のGAを同定した報告はない。花芽形成に直接に関与する要因の一つであるものは枝梢中の内生植物生長調節物質であると思われるため、新梢（枝のみ）における内生GAの同定を行った。なお、GAの抽出及び精製方法については第1図に示し、各処理による新梢のODS-HPLCにおけるGA活性を新梢の採取時期別に第2～6図に示した。



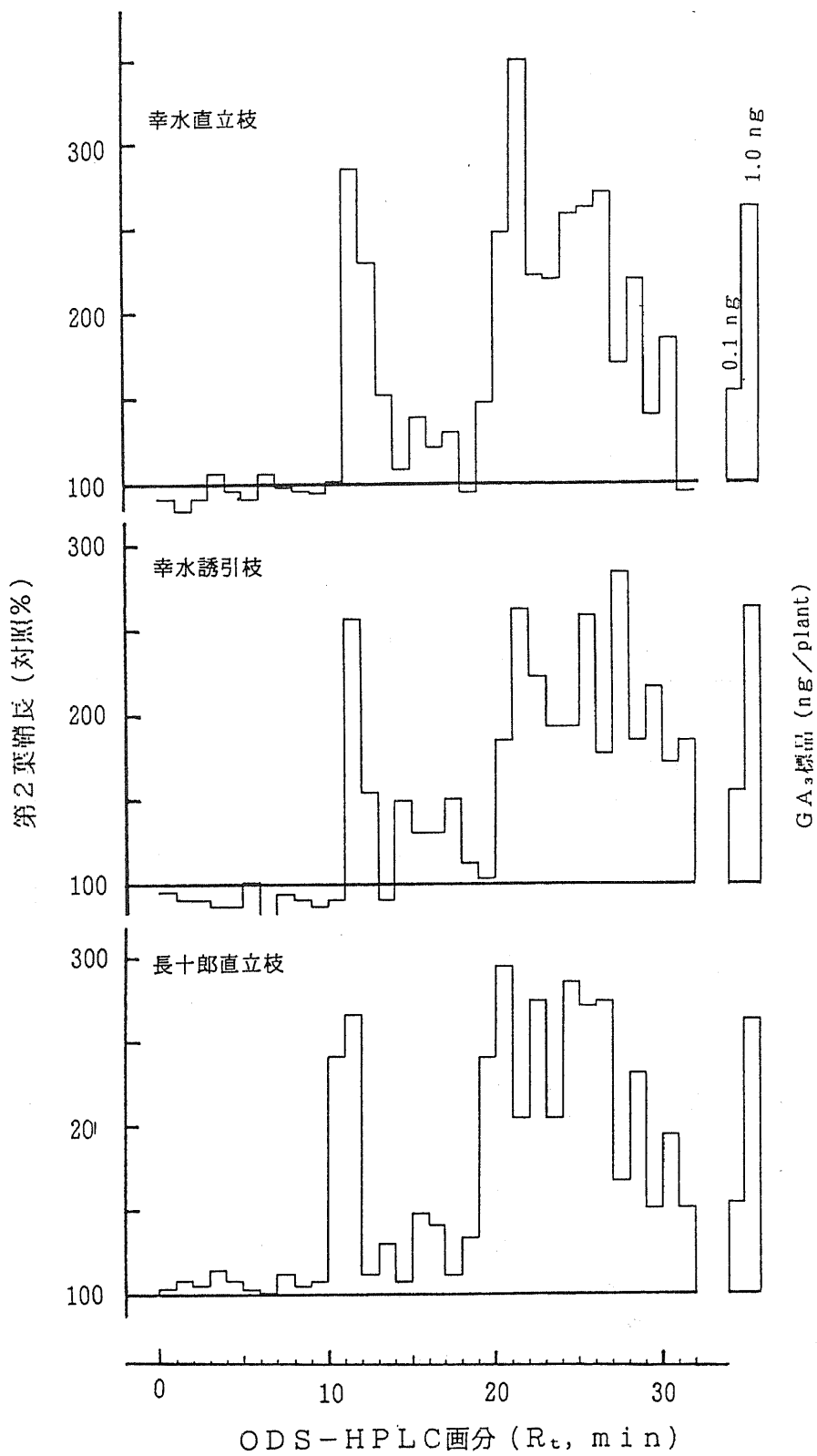
第1図 ニホンナシ新梢中のGAの抽出及び精製方法



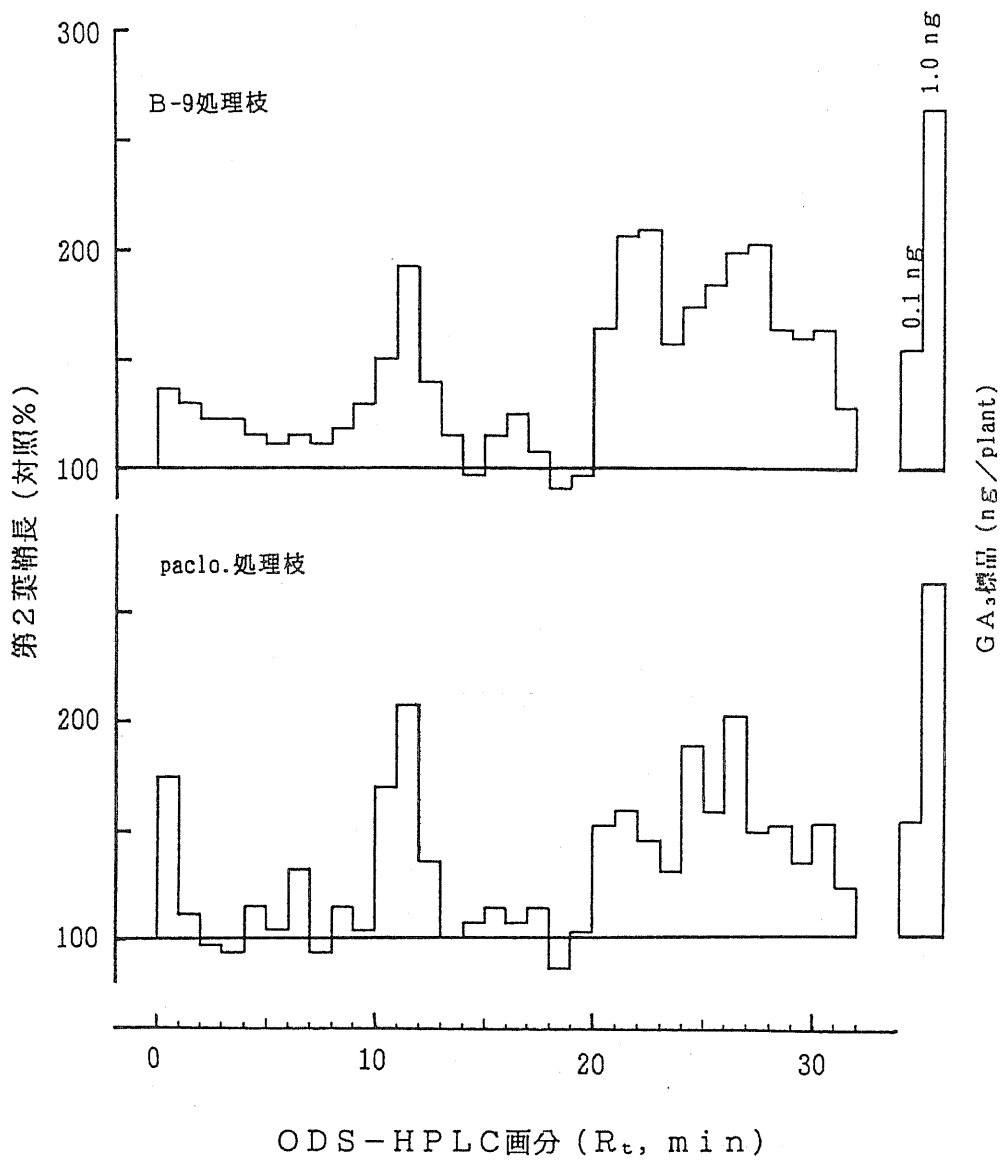
第2図 ニホンナシ新梢におけるODS-HPLC画分のGA活性(6/26)



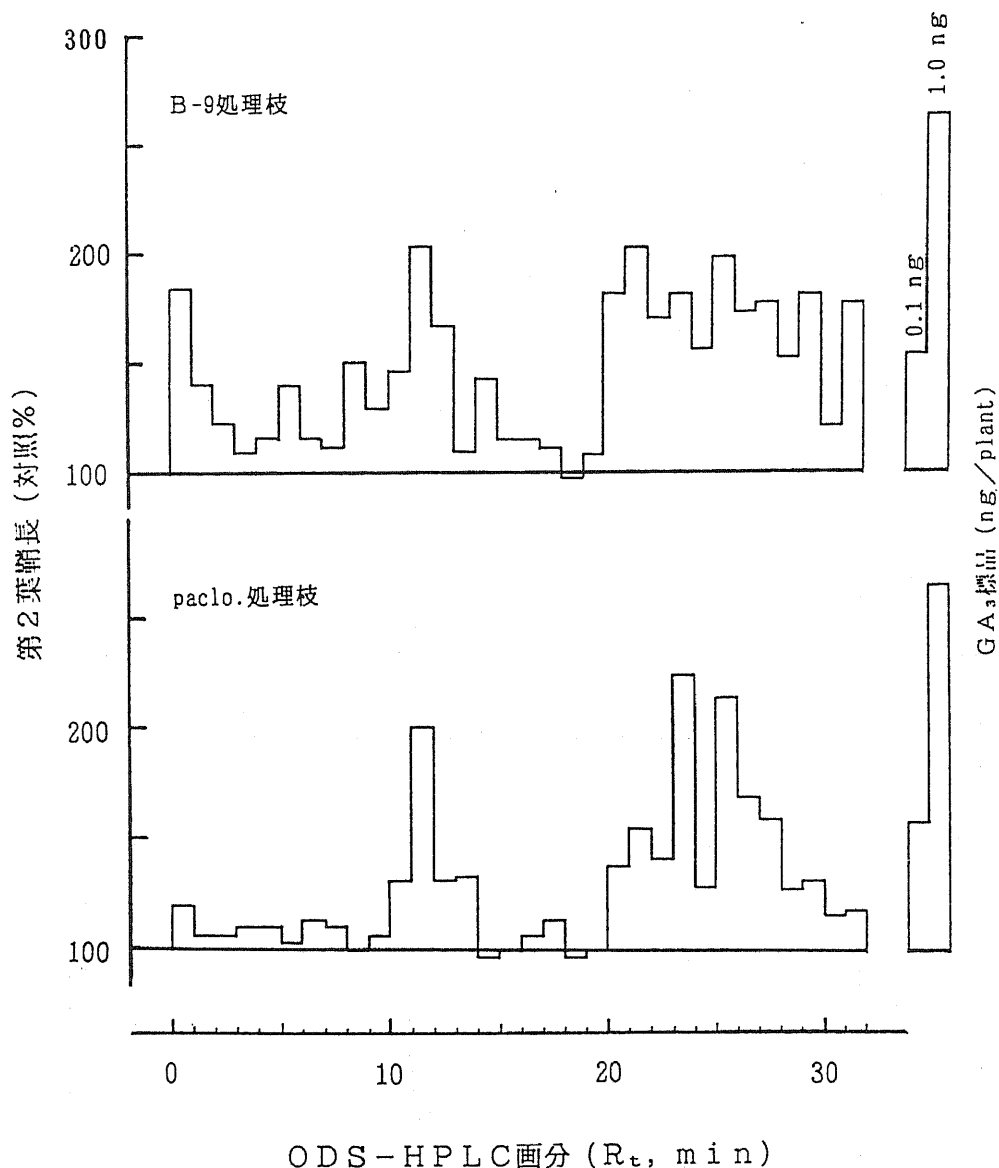
第3図 ニホンナシ新梢におけるODS-HPLC画分のGA活性 (8/2)



第4図 ニホンナシ新梢におけるODS-HPLC画分のGA活性(9/6)



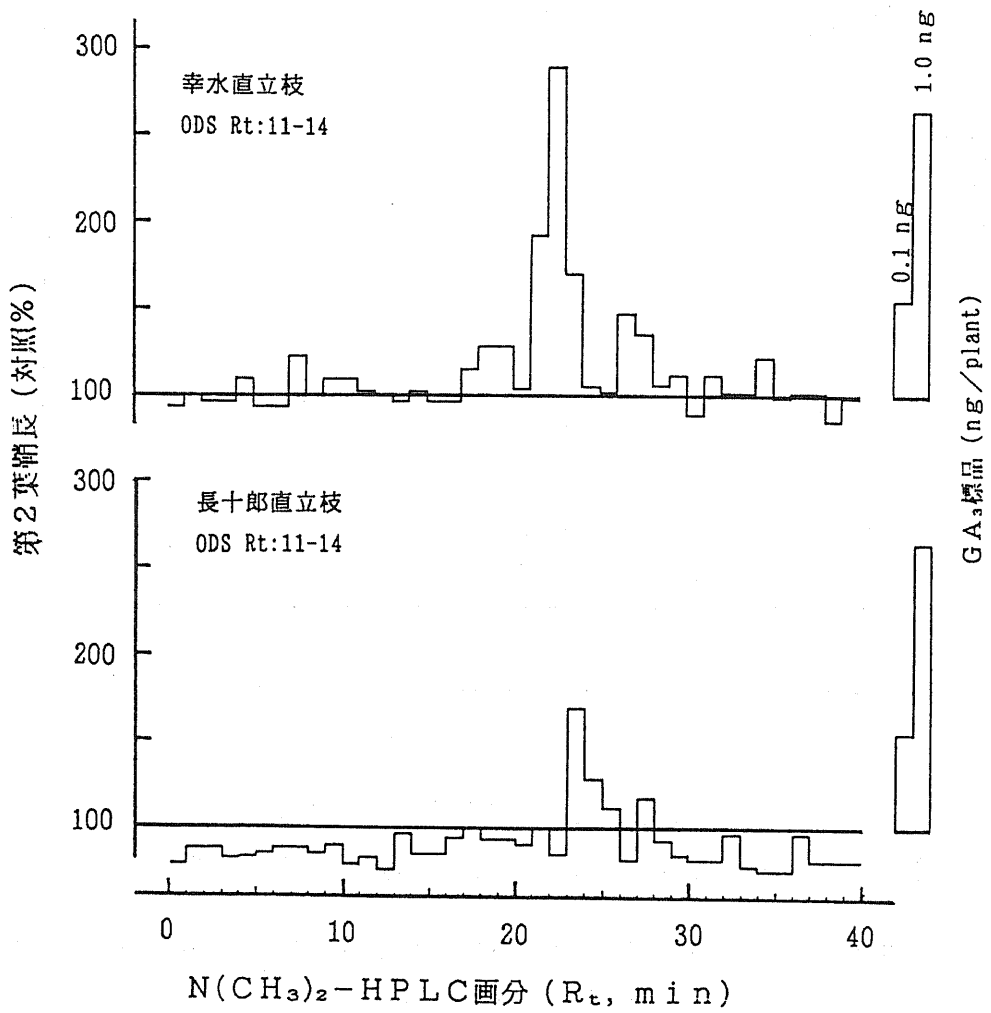
第5図 ニホンナシ新梢におけるODS-HPLC画分のGA活性 (8/2)



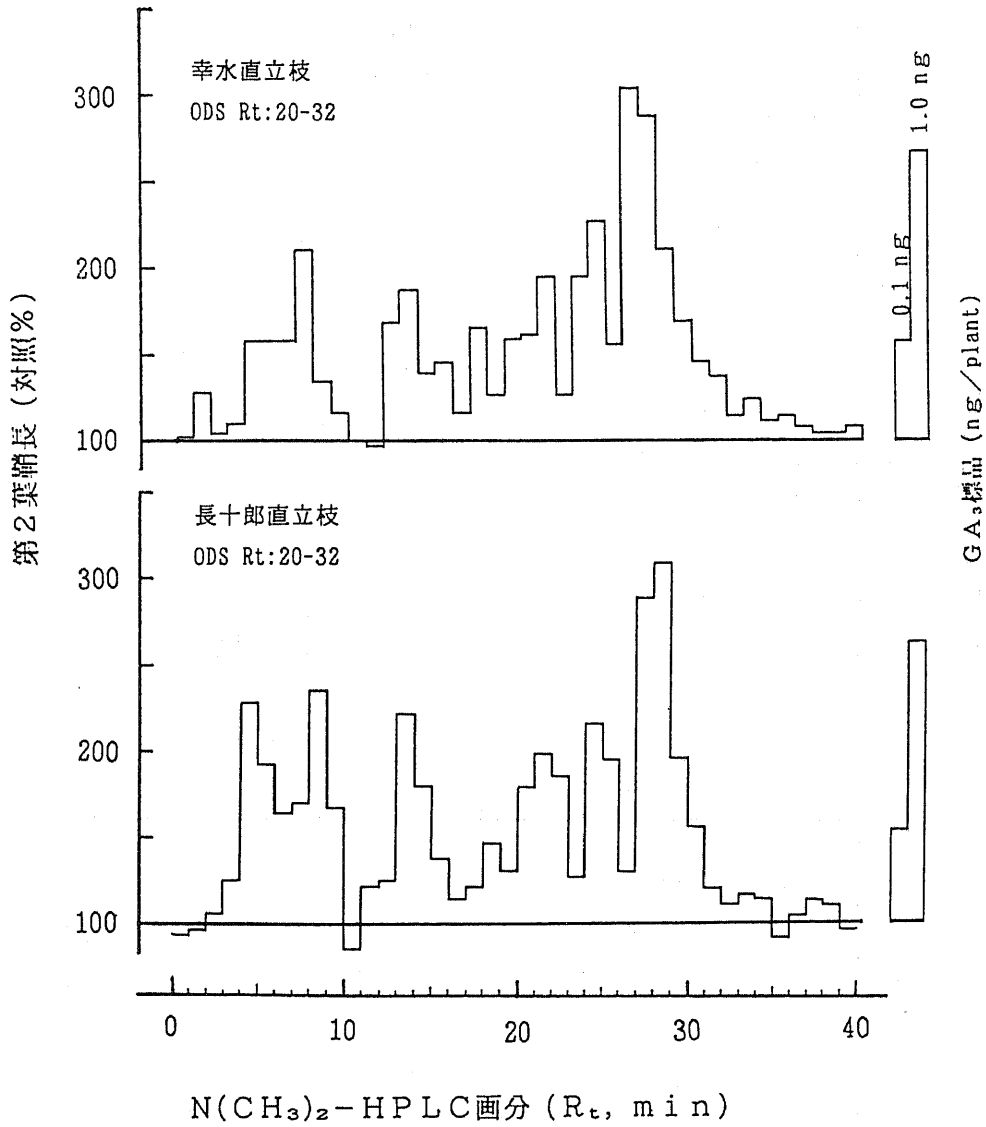
第6図 ニホンナシ新梢におけるODS-HPLC画分のGA活性(9/6)

ODS-HPLCによる精製後の各新梢のGA活性は、いずれも保持時間(Rt) 10~16分と20~32分の間において高かった。

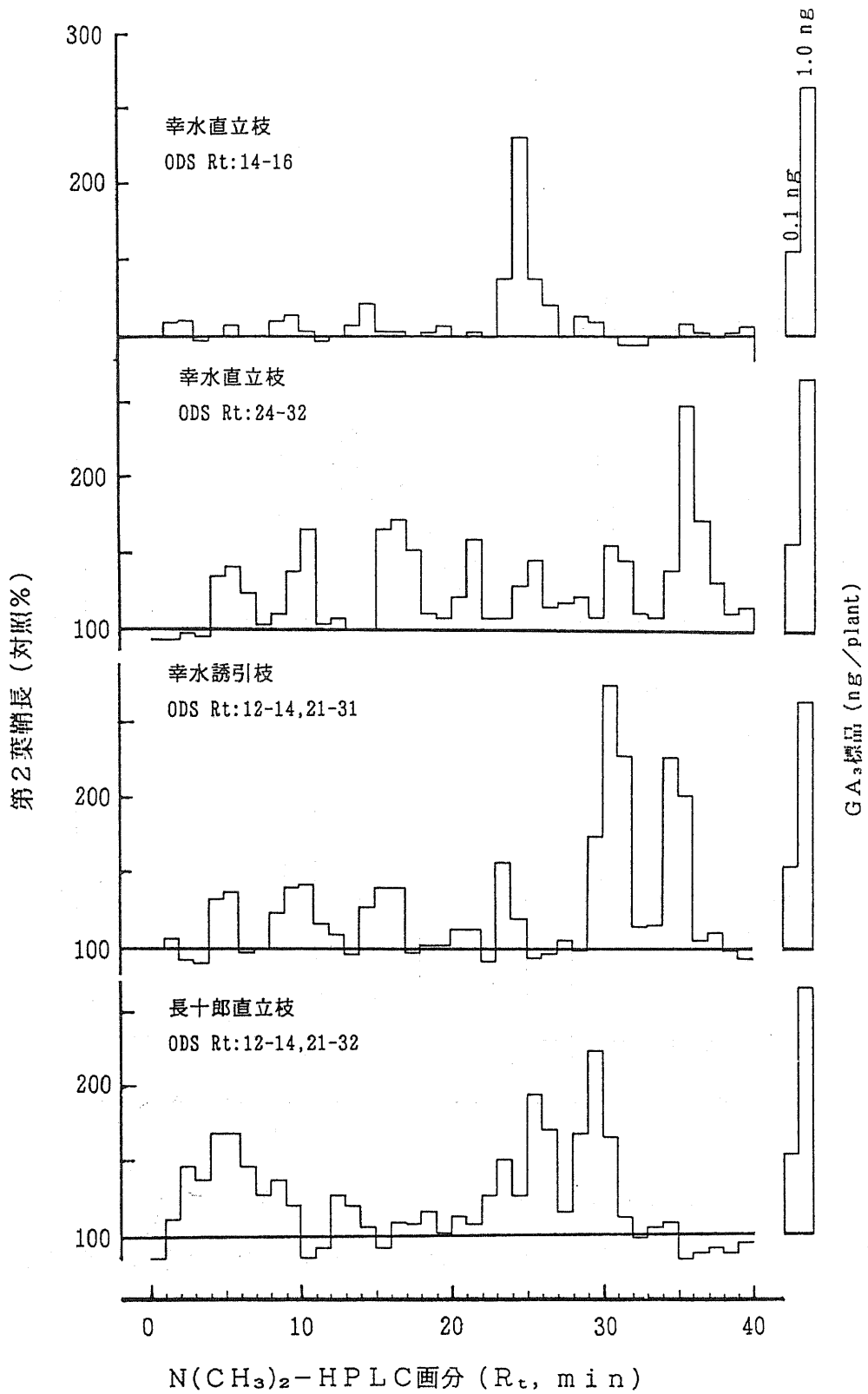
そこで、植物生長抑制剤処理以外の新梢の活性画分を集め、 $N(CH_3)_2$ カラムによってさらに精製を行った結果、第7~11図に示したように、いずれも同様なパターンを示したため、花芽分化時期にあたると思われる8月上旬の‘幸水’直立枝及び誘引枝ならびに‘長十郎’直立枝についてGC/MS分析を行った。なお、GAの同定は、GA標品のMeあるいはMeTMSi誘導体と各分画からのGC/MSにおけるKRIの比較及びfull-scanマススペクトルとの比較によって行った。



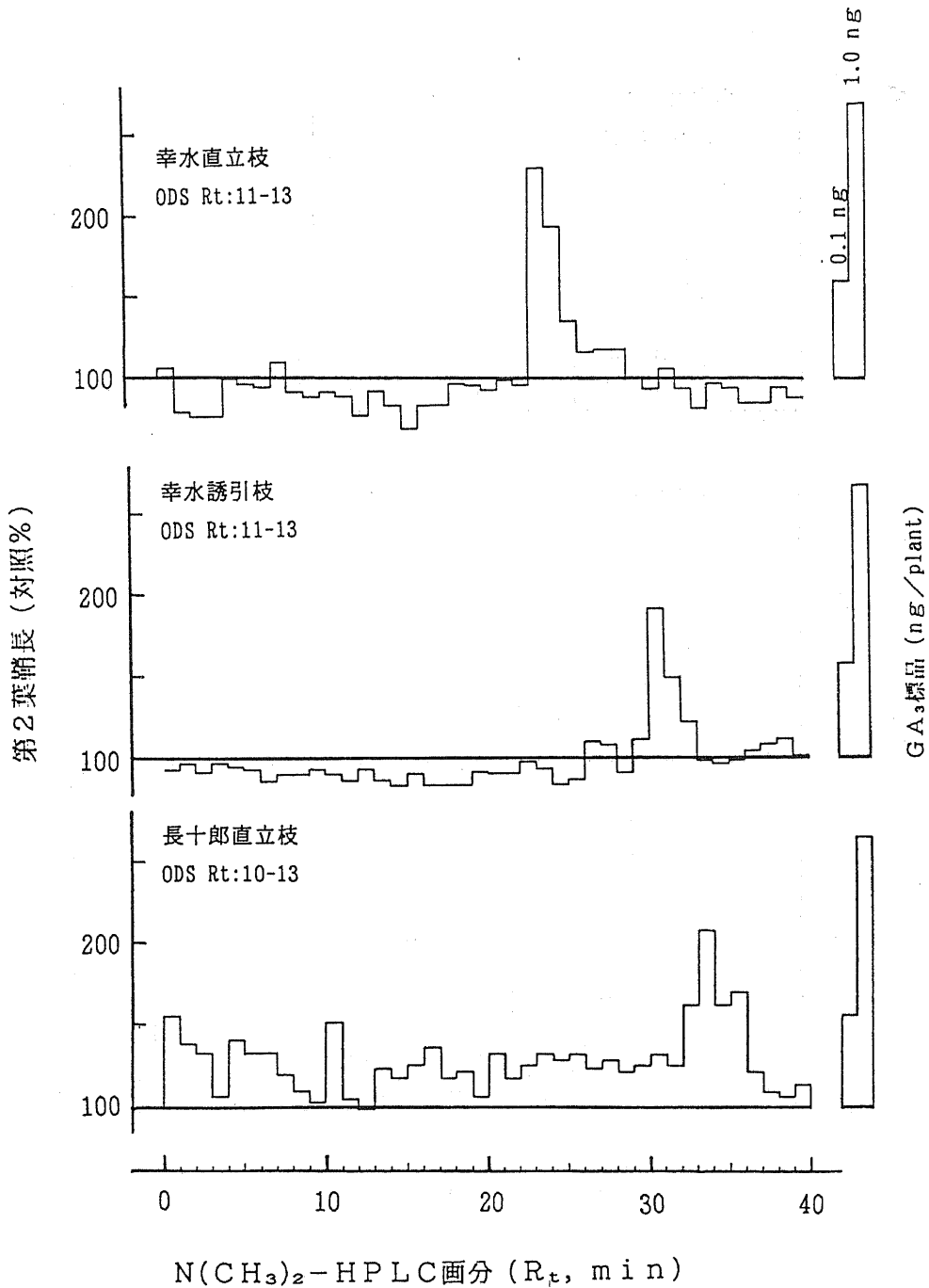
第7図 ニホンナシ新梢におけるN(CH₃)₂-HPLC画分のGA活性(6/26)



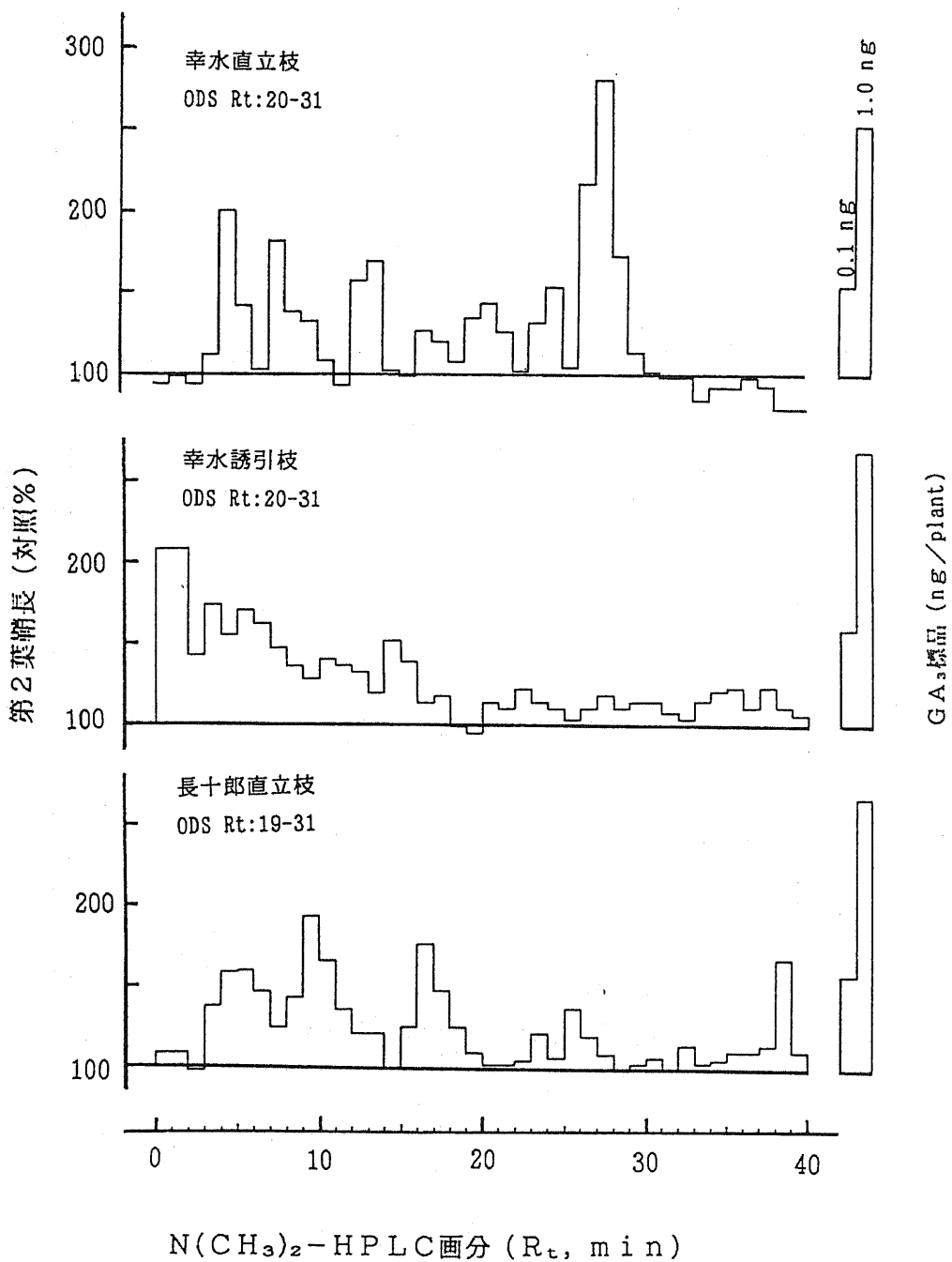
第8図 ニホンナシ新梢におけるN(CH₃)₂-HPLC画分のGA活性(6/26)



第9図 ニホンナシ新梢における $N(CH_3)_2$ -HPLC画分のGA活性 (8/2)



第10図 ニホンナシ新梢におけるN(CH₃)₂-HPLC画分のGA活性 (9/6)



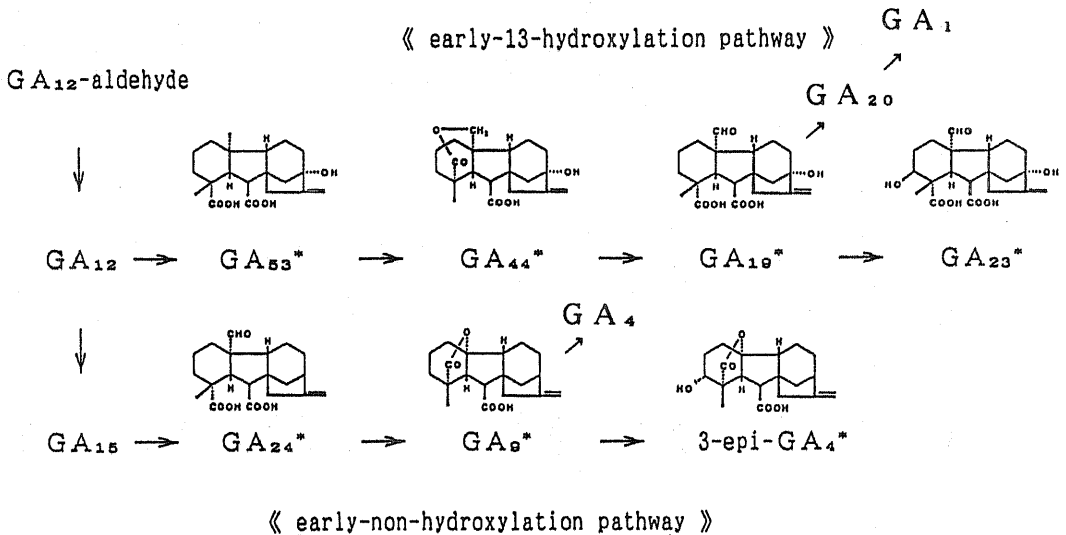
第11図 ニホンナシ新梢におけるN(CH₃)₂-HPLC画分のGA活性 (9/6)

各新梢から同定されたGAを第2表に示した。

第2表 ニホンナシ新梢における内生GAの同定

HPLC画分 (Rt)		KRI	同定されたGA	主要イオンとその相対強度 (%) (m/z)
ODS	N(CH ₃) ₂			
<辛水直立枝>				
14-16	23-27	2737	GA ₂₃	522(M ⁺ , 100), 550(47), 536(48), 504(10), 490(47), 451(100)
24-32	8-11	2496	GA ₅₃	448(M ⁺ , 100), 433(18), 388(28), 251(24), 241(27), 208(62)
〃	15-18	2767	GA ₄₄	432(M ⁺ , 100), 417(8), 373(30), 239(86), 207(57)
〃	20-22	2349	GA ₉	330(M ⁺ , 13), 298(62), 270(52), 243(25), 226(34)
〃	34-38	2587	GA ₁₉	461(M ⁺ , 18), 434(70), 402(64), 373(50), 345(40)
<辛水誘引枝>				
12-14	7-10	2492	GA ₅₃	448(M ⁺ , 100), 433(18), 389(41), 251(25), 241(34), 208(91)
21-31	16-19	2315	GA ₉	330(M ⁺ , 36), 298(100), 270(74), 243(48), 226(70)
〃	19-22	2615	3-epi-GA ₄	418(M ⁺ , 79), 400(22), 386(35), 328(28), 289(100), 225(53)
〃	24-27	2438	GA ₂₄	374(M ⁺ , 14), 342(50), 314(100), 286(95), 254(46), 225(89)
〃	28-31	2589	GA ₁₉	462(M ⁺ , 18), 447(6), 434(100), 402(41), 374(55), 345(22)
<長十郎直立枝>				
12-14	8-12	2492	GA ₅₃	448(M ⁺ , 100), 433(22), 389(35), 251(20), 241(27), 208(82)
21-32	14-17	2777	GA ₄₄	432(M ⁺ , 100), 417(10), 373(16), 239(48), 207(71)
〃	22-24	2616	3-epi-GA ₄	418(M ⁺ , 65), 400(22), 386(37), 328(32), 289(100), 225(38)
〃	29-32	2735	GA ₂₃	522(M ⁺ , 60), 509(17), 494(65), 451(45)
〃	34-36	2590	GA ₁₉	462(M ⁺ , 12), 434(100), 402(39), 374(48), 345(21)

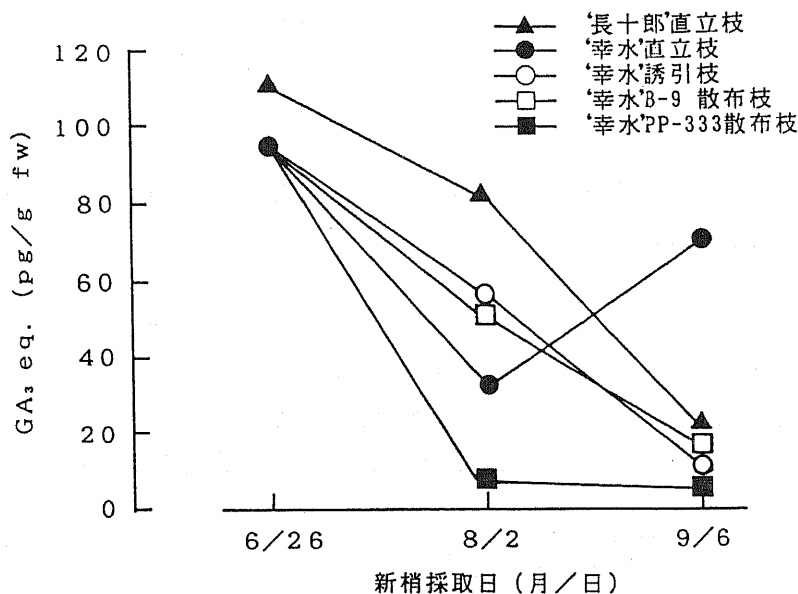
‘幸水’直立枝では、ODS-HPLCのRt:14-16の分画にはGA₂₃が、Rt:24-32からはGA₅₃、GA₄₄、GA₉、GA₁₉が、‘幸水’誘引枝からはGA₅₃、GA₉、3-epi-GA₄、GA₂₄、GA₂₃、GA₁₉が、‘長十郎’直立枝からはGA₅₃、GA₄₄、3-epi-GA₄、GA₂₄、GA₂₃、GA₁₉がそれぞれ同定され、ニホンナシ新梢中の主要GAはGA₁₉とGA₂₃と推察された。なお、それらGAの生合成経路は第12図に示したように、early-13-hydroxylation pathway及びearly-non-hydroxylation pathwayが機能していると推定されたが、主要GAがGA₁₉とGA₂₃であることから、主要生合成経路はearly-13-hydroxylation pathwayと推定される。この経路を持つ多くの植物の活性型GAはGA₁であり、一般的にはGA₁₉→GA₂₀→GA₁のように生合成が行われるが、ニホンナシではGA₂₀もGA₁もともに検出できなかった。



第12図 ニホンナシ新梢において同定されたGAの推定生合成経路
(* はGC/MS で同定されたGA)

第3節 新梢の誘引及び植物生長抑制剤処理が新梢中の GA_{19} 含量の変化に及ぼす影響

第2節で述べたように、 GA_{19} はニホンナシ新梢中で機能する GA の指標になりうると考え、各処理による新梢中の GA_{19} 含量の変化の比較を行った（第13図）。なお、 GA_{19} 含量は GA_3 等量に換算したものである。



第13図 新梢の誘引及び植物生長抑制剤処理が新梢中の GA_{19} 含量の変化に及ぼす影響

GA_{19} 含量は6月下旬から8月上旬にかけて‘幸水’の直立枝及び誘引枝、‘長十郎’直立枝中においてともに減少傾向を示した。その後、花芽着生の優れた‘幸水’誘引枝や‘長十郎’直立枝では減少を続けたが、花芽着生の劣った‘幸水’直立枝では逆に増加した。また、B-9 及び Paclobutrazol 処理を行った新梢中の GA_{19} 含量の変化をみると、B-9 処理枝では‘幸水’誘引枝とほとんど同様の变化を示したが、Paclobutrazol 処理枝では処理後、他の新梢よりも著しく急減し、8月上旬から9月上旬にかけてその含量が顕著に低かった。第1節で述べた結果と以上の結果より、B-9 及び Paclobutrazol 処理によって新梢伸長停止期頃から花芽分化時期にかけて GA_{19} 含量が減少する傾向がみられたことと

花芽着生率が増加したことから、GA₁₉含量の減少がニホンナシにおける花芽形成誘導の一原因になっているのではないかと推察された。すなわち、GAの生合成やGAの活性を抑制することによって栄養生長から生殖生長への移行が促進された結果と考えられる。なお、‘幸水’直立枝でも8月上旬のGA₁₉含量は、‘長十郎’直立枝、‘幸水’誘引枝及びB-9 処理枝よりも低かったことから、‘幸水’直立枝でのそれ以後のGA₁₉含量の急増が花芽形成阻害に作用している可能性があるものと推察された。一方、誘引処理という物理的刺激によっても花芽着生率が増加し、GA₁₉含量が低下したが、その原因は依然として不明である。

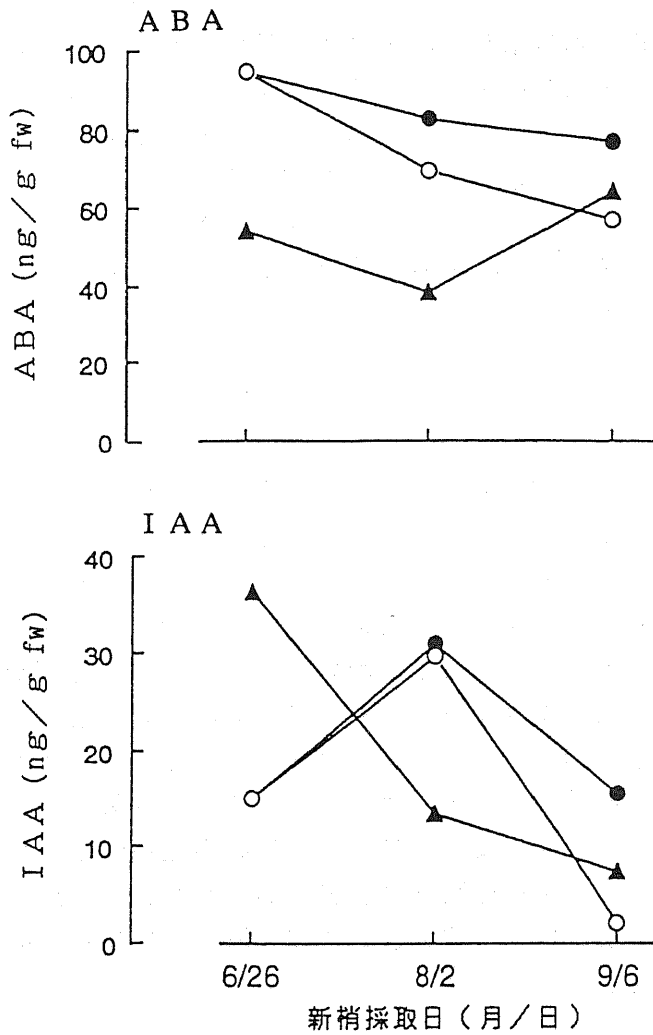
第4節 新梢の誘引処理が新梢中のABA及びIAA含量の変化に及ぼす影響

本研究ではGAを主体にして花芽形成との関連を調査したものであるが、誘引処理に関しては、新梢中のABA及びIAAの同定を行い、その含量の変化を調査し、花芽形成との関連を検討した。なお、ABA及びIAAの抽出及び精製方法を第14図に示し、結果を第15図に示した。

```

試料 (各10g fw)
  | MeOH抽出・ろ過 (×3)
MeOH抽出液
  | 内部標準(ABA:100ng, IAA:50ng)を加え、減圧濃縮
水層 (100ml)
  | pH 3.0に調整後、EtOAc抽出 (50ml×3)
EtOAc層 (450ml)
  | 0.5M リン酸緩衝液抽出 (50ml×3)
リン酸緩衝液層 (450ml)
  | pH 3.0に調整後、CH2Cl2抽出 (50ml×3)
CH2Cl2層 (450ml)
  | 無水Na2SO4で脱水後、濃縮乾固
酸性CH2Cl2区 (AD区)
  | Sep-Pak C18 (ODS) カートリッジ
50%・80% MeOH溶出区
  | N(CH3)2-HPLC
ABA・IAA 溶出区
  | Me化
GC/MS 分析
  
```

第14図 ニホンナシ新梢中のABA及びIAAの抽出及び精製方法



第15図 新梢の誘引処理が新梢中のABA及びIAA含量の変化に及ぼす影響

- ▲ '長十郎' 直立枝
- '幸水' 直立枝
- '幸水' 誘引枝

ABAの内生レベルは6月下旬から9月上旬にかけて花芽着生率の高い‘長十郎’直立枝及び‘幸水’誘引枝において、花芽着生率の劣る‘幸水’直立枝よりもやや低い傾向を示し、特に‘長十郎’直立枝では6月下旬から8月上旬にかけてその傾向が顕著であった。一方、IAA含量は、‘長十郎’直立枝においては調査期間中減少を続けたが、‘幸水’直立枝及び誘引枝では6月下旬から8月上旬にかけて急激に増加し、その後急減した。このように、ABA及びIAA含量の変化では‘幸水’直立枝と誘引枝の間の差異がほとんど認められず、また、‘長十郎’直立枝では‘幸水’とは異なる変化のパターンを示したことから、ABA及びIAAと花芽形成との関連を推察することはできなかった。

まとめ

本研究では、タンパク質の合成及び代謝と内生植物生長調節物質との関連を調査できなかったが、これまでに報告がないニホンナシ新梢中の内生GAの同定を試み、主要GAはGA₁₉とGA₂₃であると推察し、植物生長抑制剤処理を花芽分化期前に行うと花芽着生率が増加し、花芽分化期にGA₁₉含量が減少することがわかった。一方、花芽形成とABA及びIAAとの関連を直立枝と誘引枝でのそれらの含量を比較することによって検討したが、その関連を推察することはできなかった。今後は、誘引処理方法（処理時期や誘引角度など）の検討や新梢の採取間隔を密にするなどして、GA₁₉またはGA₂₃と他の内生植物生長調節物質との量的バランスなどをさらに詳細に調査する必要があると思われ、併せて、本来の目的であるタンパク質の合成及び代謝との関連を追究する必要があると思われた。

引用文献

1. Bukovac, M. J. and E. Yuda. 1979. Endogenous plant growth substances in developing fruit of Prunus cerasus L. VII. Isolation of gibberellin A₃₂. *Plant Physiol.* 63:129-132.
2. Coombe, B. G. and M. E. Tate. 1970. A polar gibberellin from apricot seed. In D. J. Carr, ed. *Plant Growth Substances*. Springer-Verlag, Berlin. pp158-165.
3. Goto, A., H. Yamane, N. Takahashi and K. Hirose. 1989. Identification of nine gibberellins from young fruit of satsuma mandarin (Citrus unshu Marc.). *Agric. Biol. Chem.* 53(10)2817-2818.
4. Kessler, B., R. Bak and A. Cohen. 1959. Flowering in fruit trees and annual plants as affected by purines, pyrimidines and triiodobenzoic acid. *Plant Physiol.* 34:605-608.
5. Martin, G. C., F. G. Dennis, Jr., J. MacMillan and P. Gaskin. 1977. Hormones in pear seeds I. levels of gibberellins, abscisic acid, phaseic acid, and two metabolites of dihydrophaseic acid in immature seeds of Pyrus communis L.. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102(1):16-19.
6. 松井弘之・足立浩代・湯田英二・中川昌一. 1987. 果樹の葉及び枝梢中のタンパク質・アミノ酸含量の季節的消長. *園学要旨*. 昭62春. :82-83.
7. Nakagawa, S., H. Matsui, E. Yuda, N. Murofushi, N. Takahashi, N. Akimori and S. Hishida. 1979. Biologically active gibberellins in immature seeds of Pyrus serotina. *Phytochemistry*. 18:1695-1697.
8. 中川昌一. 1988. 花芽分化の内的要因. *果樹園芸原論*. p. 50-67. 養賢堂. 東京.
9. Ramsay, J. and G. C. Martin. 1970. Seasonal changes in growth promoters and inhibitors in bud of apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95(5):569-574.
10. Ramsay, J. and G. C. Martin. 1970. Isolation and identification of a growth inhibitor in spur buds of apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95(5):574-577.
11. 酒井慎吾. 1990. 植物ホルモン. 柴岡弘郎編. 生長と分化. p. 1-20. 朝倉書店. 東京.

12. Wareing, H.M. and M. El-Antably. 1970. Cellular and molecular aspects of floral induction. Ed. Bernier, G. Long man Ltd.: 285-303.
13. Yamaguchi, I., T. Yokota, N. Murofushi, N. Takahashi and Y. Ogawa. 1970. Isolation and structure of a new gibberellin from immature seeds of Prunus persica. Agric. Biol. Chem. 39: 2399-2403.
14. Yuda, E., S. Nakagawa, N. Murofushi, T. Yokota, N. Takahashi, M. Koshioka, Y. Murakami, D. Pearce, R. P. Pharis, G. L. Patrick, L. N. Mander and P. Kraft-Klaunzer. 1992. Endogenous gibberellins in the immature seed and pericarp of loquat (Eriobotrya japonica). Biosci. Biotech. Biochem. 56 (1): 17-20.