

第5章 ニホンナシ‘幸水’の花器および幼果におけるジャスモン酸関連物質

PDJ(*n*-propyl dihydrojasmonate)処理による晩霜害回避の可能性

5-1 緒言

第3章の結果により、ニホンナシの花器における霜害は、氷晶の形成とその伝搬が主な原因と考えられた。低温耐性がない植物の細胞や組織は、致命的な細胞内凍結しやすく、そのため低温により傷害を受けやすい。ニホンナシの花器もデハードニングが進み、開花が近づくにつれて水分含量が増えるにしたがい、細胞内の溶質(主に糖)が減少するにともなって、低温耐性が減少して行くことが第2章において示されている。また、ニホンナシの花器においては、花器における生体膜脂質中の不飽和度が低下するにつれて低温耐性が低下するとも報告されている(Liaoら、1997)。

霜害の回避や軽減は果実生産における重要な課題であり、危険地での栽培を避けたり、被害に遭いにくい品種や樹種の選定などの栽培的対策が昔から行われてきた。また霜害発生の予報をもとに送風法や被覆法、氷結散水法、燃料法などの微気象の調節による防止法が、農家において一般的に行われている。しかし、晩霜の発生は自然現象であるために、完全に防ぐことは困難な場合が多い。植物成長調節物質による被害の軽減を目的とした研究も行われているが、まだ確実な効果を期待できるまでには至っていない(小林、1985)。

これまでストレスに関与する植物ホルモンとしてアブシジン酸(ABA)が広く研究

されており、外生的なABA処理によって低温耐性を賦与できることがシロイヌナズナ (Mantylaら、1995)、牧草の一種であるチャヒキ(Ishikawaら、1990; Taninoら、1990; Ishikawaら、1995)などで知られている。しかし、ABAがどのような機構によって低温耐性を賦与しているかについてはあまり分かっていない。一方、植物成長調節物質の一つであるジャスモン酸は、ABAと似た生理作用を示し、また傷害刺激やストレスのシグナル伝達物質としての役割も報告(Seoら、1999)されており、また低温傷害がメチルジャスモン酸処理で緩和(Wang・Buta、1994; Gonzalez-Aguilarら、2000; Dingら、2001、2002)されており、ニホンナシの花器における低温ストレスに対しても有効に働く可能性が考えられた。そこで、本章ではジャスモン酸処理(PDJ、*n*-propyl dihydrojasmonate))による晩霜害回避が可能であるかどうかについて検討した。

5-2 材料および方法

供試植物は、筑波大学農林技術センター内で栽培されている20年生ニホンナシ‘幸水’成木の花器と幼果を用いた。1999年4月9日(展葉期)、4月15日(花蕾期)に開花前の発育枝単位に、PDJ水溶液(5および50ppm)を表面が全体的に濡れる程度にハンドスプレーで散布処理した。その後、花器または幼果を1999年4月18日(花蕾期)、4月21日(満開期)、4月30日(幼果期)に採取し、実験材料とした(第30図)。凍結試験は第2章と同様に行った。すなわち採取した花器や幼果をポリエチレンの袋に入れ、5

℃、0℃でそれぞれ30分ずつ予冷した後、5℃/hの冷却速度で-5℃まで冷却した。-5℃に達した時点ですぐに取り出し、0℃で融解し、5℃で一晩おいた後の電解質漏出量と褐変の程度を測定し低温耐性を評価した。褐変の程度は0から3までの4段階(0-褐変部無し、1-胚珠、雌ずいが褐変、2-花托、花柄まで褐変、3-全体が褐変)であらわした。2本の成木から採取した花そうはそれぞれ処理区ごとに、花そうから3~4番花を選び、電解質漏出率、褐変の程度ともに6花ずつ測定を行った。

また、2000年には4月16日(花蕾期)にPDJ溶液(5ppm)を散布処理し、3日後の4月19日に結果枝ごと花器を採取し、凍結試験を行った。採取した結果枝は3花そうずつになるよう分断し、乾燥を防ぐため切り口にシリコンオイルを塗布し、氷とともにポリエチレンの袋に入れた。その後アルコールバスに設置した広口の試験管の中に入れた。その後5℃、0℃でそれぞれ30分ずつ予冷した後、2℃/hの冷却速度で-3、-5、-7℃まで冷却した。設定温度に達した時点で、それぞれ水中で1時間、ゆっくりと融解し、5℃で一週間おいた後、花器を花卉、雄ずい、雌ずい、花托(がく片、胚珠を含む)、花柄に分解し、前述と同様、電解質漏出率は各処理区ごとに3サンプル、褐変の程度は10サンプルずつ測定を行い、低温耐性を評価した。

内生成分については凍結試験と同様の試料を遊離アミノ酸、糖、内生ABAについてそれぞれ測定した。測定方法は第2章3節で述べたとおりである。

実験に用いたPDJは植物体内でジャスモン酸と同様の生理作用を持ち、化学的に安定であるため圃場での処理に適しており、そして多くの場合ABAよりも低濃度で

より高い効果を示すと考えられている(竹内・禿、1997; Gemma、2000)。

5-3 結果および考察

1999年の凍結試験の結果を第31図に示した。PDJ処理区は対照区に比べ、褐変の程度および電解質漏出率ともに低い値に抑えられた。花器全体での電解質漏出率は、花蕾期の対照区で37.9%に対し、PDJ処理区の平均値は16.6%であった。同様に満開期においても、PDJ処理は電解質漏出率を73.1%から47.8%に抑えた。すなわち、PDJ処理が開花期の花器における低温に対する耐性を高める傾向が認められた。しかし、PDJ処理濃度や処理期の間、一定の傾向を見出すまでには至らなかった。花蕾期(4月18日)の試験においては、4月9日のPDJ 5ppm散布処理で褐変が抑えられており、効果の高いことが伺えた。また、満開期(4月21日)においては、4月15日のPDJ 50ppm散布処理区が最も効果があった。なお、幼果期(4月30日)においては対照区、処理区の間、有意な差は認められなかった。これが生育ステージの違いによるものなのか、それともPDJの処理時期によるものなのかは、今のところ不明である。

2000年の凍結試験、すなわち開花期における花蕾期、満開期の花器の構成器官ごとの電解質漏出率を第4表に示した。特に満開期のPDJ処理した花托と花柄において、-5°Cの凍結試験後、52.6%から22.3%、40.0%から19.6%へと、電解質漏出率が減少していた。同様に褐変についても、花蕾期および満開期ともにPDJ処理は全体的に傷害を抑える傾向であった(第32図)。前章で述べたように、凍結試験におい

て、まず花托の表皮の下に空洞ができる浮き皮がおこり、胚珠や雌ずいにおいて褐変の傷害がみられ、温度の低下とともに花柄などにも傷害が拡がっていった。ニホンナシ‘幸水’の花器の各構成器官は、それぞれ凍結に対する感受性が異なると考えられたが、PDJ処理は全体的に花器の低温耐性を高め、低温傷害を緩和した。

以上のように、ニホンナシ‘幸水’の花器における低温の被害は、PDJ処理によって緩和される傾向にあった。

遊離アミノ酸・糖含量

ニホンナシ‘幸水’の花器の遊離アミノ酸含量を第5表に示した。第2章2節で示したように11種のアミノ酸について検出、同定できた。PDJ処理は花（花弁、雄ずい、雌ずい、がく片、花托を含む花柄を取り除いたもの）および花柄において、明らかにプロリン含量を増加させた。特に花においては対照区で $4.84 \mu\text{M/gFW}$ であったのに対し、PDJ処理区においては $8.82 \mu\text{M/gFW}$ と約2倍に増加した。反対にアスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニンは、PDJ処理により減少した。花柄ではグリシンとアラニンが減少した。

第6表に示すように、1999年のPDJ処理はニホンナシ‘幸水’の花器、特に花(花柄以外の部位)において明らかに糖含量を上昇させた。すなわちソルビトールは 0.79 mg/gFW から 6.81 mg/g FW へ、スクロースは 3.99 mg/g FW から 20.56 mg/g FW へ上昇した。花柄部では花よりは顕著ではなかったが、同様に糖含量がPDJ処

理により上昇する傾向があった。

次に花器の各構成器官は、それぞれ凍結に対する感受性が異なるので、第7表が示すように花器の構成部位ごとの糖含量を調査した。測定したいずれの器官においても全糖含量は、PDJ処理によって増加する傾向を示した。特に花托(胚珠、子房を含む)、雌ずい、花柄において、明らかに全糖含量が上昇した。個々の部位でみると、PDJ処理によってスクロースが雌ずい・花柄で、グルコースは花托において明らかに増加した。花卉においてはフルクトースが上昇し、ソルビトールは雌ずい、花托において増加した。第3章で示したように低温試験における傷害を受けやすかった雌ずい、花托(胚珠を含む)では全糖含量、ソルビトール、グルコース含量が他の部位に比べ低かったが、PDJ処理は雌ずい、花托で全糖含量を明らかに増加させた。特に花托においては、グルコースが7.10mg/gFWから14.20 mg/gFWと2倍になっており、ソルビトールも明らかに増加した。

ストレス条件下での植物では、ある種のアミノ酸含量が増加することが報告されている(Kozukueら、1984; Szalaiら、1997)。高等植物におけるアミノ酸の集積が、ストレス反応なのかは不明であるが、この溶質の集積は浸透圧を調節していると考えられている(Bohnertら、1995)。カンキツの葉中において低温処理の間、プロリン含量は上昇し(Kushad・Yelenovsky、1987)、また低温処理したトウモロコシでは葉のアミノ酸含量が増加している(Szalaiら、1997)。また、プロリンは水に非常に溶けやすく、高い凍結防御作用を持っていることが知られている(Withers・

King, 1979)。

糖もアミノ酸同様、低温耐性に大きく関与していることが知られている。糖の中ではグルコースが最も凍害防御効果が高く、ソルビトール、ラフィノースも高い効果を示す(酒井、1982)。今回の実験においても、低温試験によって傷害を受けやすかった雌ずい、花托、胚珠において、ソルビトール、グルコース含量が他の部位に比べ低く、全糖含量も比較的低い値であった。一方、花器においてはソルビトール、グルコースがPDJ処理により増加した。ソルビトールはプロリン同様、細胞内で浸透圧を調節する働きのある適合溶質(中村・高倍、1999)として役割を担っている。Sasakiら(1998)によれば低温耐性の変化に伴う水ストレスが低温馴化、脱馴化中の糖含量の変化と関係しているという。

果樹の花器が氷点下の低温に遭遇した場合、花器は過冷却することで生存することができる(Carterら、1999)。エテホン処理したモモ花芽は雌ずいのソルビトールおよびスクロース含量が増加し、その結果、低温耐性が賦与された(Durner・Gianfagna、1991)。本研究におけるニホンナシの花器においてもプロリン、ソルビトールおよび全糖含量がPDJ処理により増加した。水溶性のプロリンやソルビトールなどの適合溶質の集積は細胞液の凍結温度を低下させ、植物の過冷却する能力を変化させるので、ニホンナシ花器において過冷却により、凍結が回避された可能性が示唆された。また、凍結やそれに伴う脱水の際にも、原形質膜やタンパク質がこれらの溶質により保護(Sakai・Yoshida、1968；吉田、1999)されたかもしれない。

PDJ処理は明らかに糖含量を増加させたが、全アミノ酸量はそれほど変化しなかった。したがってPDJ処理による低温傷害の緩和は、アミノ酸よりも糖の影響が強く表れたと考えられた。

内生ABA含量

開花期の花における内生のABA含量は、非常に微量で1999年には検出することができなかった。花柄においては花蕾期から満開期とステージが進むにしたがって、144.1ng/gFWから672.9 ng/gFWとABA含量が増加した。PDJ処理は、花蕾期では757.9ng/gFW、満開期には 661.9ng/gFW であり、ABA含量を上昇させた(第8表)。

また、花器の部位ごとに測定したところ、検出できた範囲では、PDJ処理はいずれの部位でもABA含量を増加する傾向を示した。とくにがく片においては顕著であった。(第33図)。

低温耐性とABAの関与については、いくつかの植物の低温耐性を明らかに増加させ(Chen・Gusta、1983; Langら、1994)、また低温順化処理によって低温耐性が高まるジャガイモの品種では、内生のABAが増加し、低温耐性が高まらない品種では内生のABAが増加しない(Chenら、1983)。さらに乾燥処理はABA含有量を増加させることが知られているが、乾燥処理によってシロイヌナズナは低温耐性が高まること、Langら(1994)によって報告されている。低温処理の代わりに、外生的

なABA処理によっても、シロイヌナズナの低温耐性が獲得されている(Mantylaら、1995)。同様の結果は、牧草の一種であるチャヒキ(Ishikawaら、1990; Taninoら、1990; Ishikawaら、1995)などで得られている。

低温試験後の傷害を抑制できたPDJ処理区のABA含量は、対照区に比べ比較的高い傾向が示された。また、部位間で比較すると同一器官同士の比較では、傷害が少ない区ほどABA含量が高かった。ABA含量が高かったがく片では、あまり傷害の様子が見られなかったが、花柄に比べABA含量の高い花托では花柄よりも傷害を受けやすかった。このことから、花器の部位ごとにABAに対する感受性が異なることが示唆され、部位間の低温耐性の差異は、ABA含量のみの一元的な解釈では説明できないことが分かった。

ABAは、果実を含む様々なシンク器官への、糖の蓄積を促進することが知られており(近藤、1994; 小橋、1998; Kobashi、2000)、またモモ果実においては、ソルビトール、フルクトース、グルコースの取り込みがABAによって、能動輸送・拡散の両方の経路で促進されていることが分かっている(小橋、2000)。したがって今回の実験においても、ニホンナシの花器においての糖含量の増加は、ABAによる影響である可能性も考えられた。さらにメチルジャスモン酸処理したズッキーニ果実の外果皮では、対照区果実よりも高いABA含量であり(Wang・Buta、1994)、同様にPDJ処理により内生のABA含量が増加することはカキ(Gemmaら、1998)、ブドウ(東川、1998)で報告されている。したがって、PDJ処理は花器において内生ABA含

量を高める傾向があったので、PDJ処理の効果はABAを介して行われている可能性も高い。

さらに、ジャスモン酸類はストレス反応におけるシグナル伝達のカスケードで重要な役割を果たしている。加えて、その生合成経路を考えるとジャスモン酸は原形質膜のリノレン酸から合成される。細胞は低温にさらされると、生体膜の一部が液晶層からゲル層に転移する。この生体膜の相転移は膜の流動性を低下させ、膜透過性や膜タンパク質の活性に大きな影響を与える。生体膜の相転移温度は膜脂質の不飽和度に規定されている(三上・村田、1999)。このように脂質は、凍結時の原形質膜の安定性に大きく関与している。PDJが原形質膜を構成している脂質の状態を変更し、凍結時の膜の安定性に影響を与えたのかもしれない。

一方、第3章で示したように、花器における氷晶の形成とその伝搬は、傷害の様子に大きく関わっており、この凍結様式を制御することは、植物における低温耐性の重要な機構である。PDJ処理は溶質を増加させ、花器中の組織や器官における過冷却を促進し、さらに凍結脱水時に細胞膜を損傷から保護していると考えられた。またPDJ処理は、氷核形成の温度や氷晶の伝搬する経路に影響を与え、凍結様式を変更し、ニホンナシ‘幸水’の花器を低温による傷害から保護しているのかもしれない。

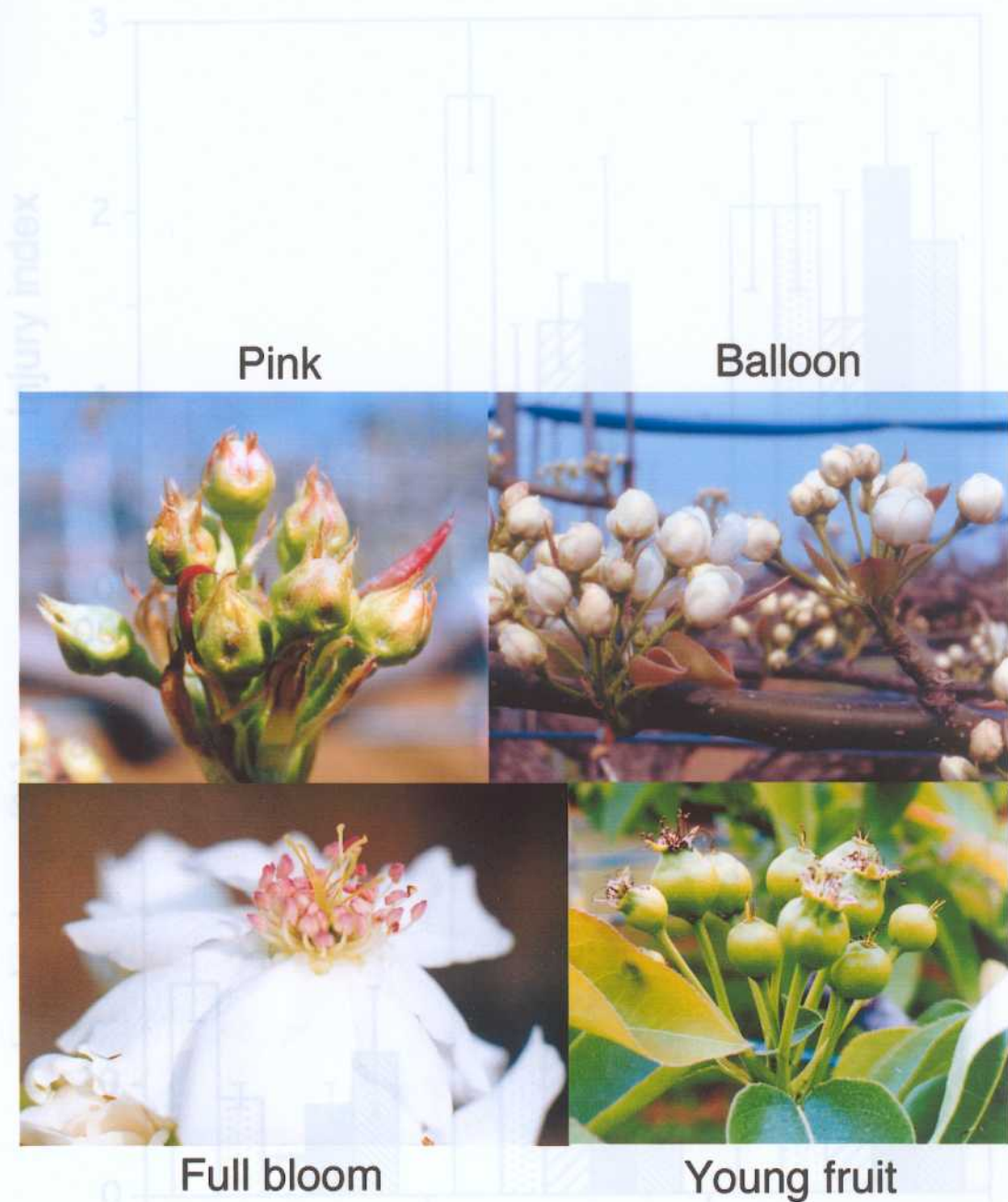


Fig. 30. Growth stages of 'Kousui' Japanese pear; pink, balloon, full bloom and young fruit.

(Fig. 31) Injury index and ion leakage (%) of PDJ-treated florets of 'Kousui' exposed to -5°C for 1-h in 1999. Freezing injury was rated on a scale of 0 to 3 where 0=no injury, 1=ovule and pistil were damaged, 2= damage spread to receptacle and/or peduncle, 3= flower damaged completely. Vertical bars represent S.E. (n=6)

- Cont.
- ▤ 4/9 PDJ 5 ppm
- ▥ 4/9 PDJ 50 ppm
- 4/15 PDJ 5 ppm
- ▨ 4/15 PDJ 50 ppm

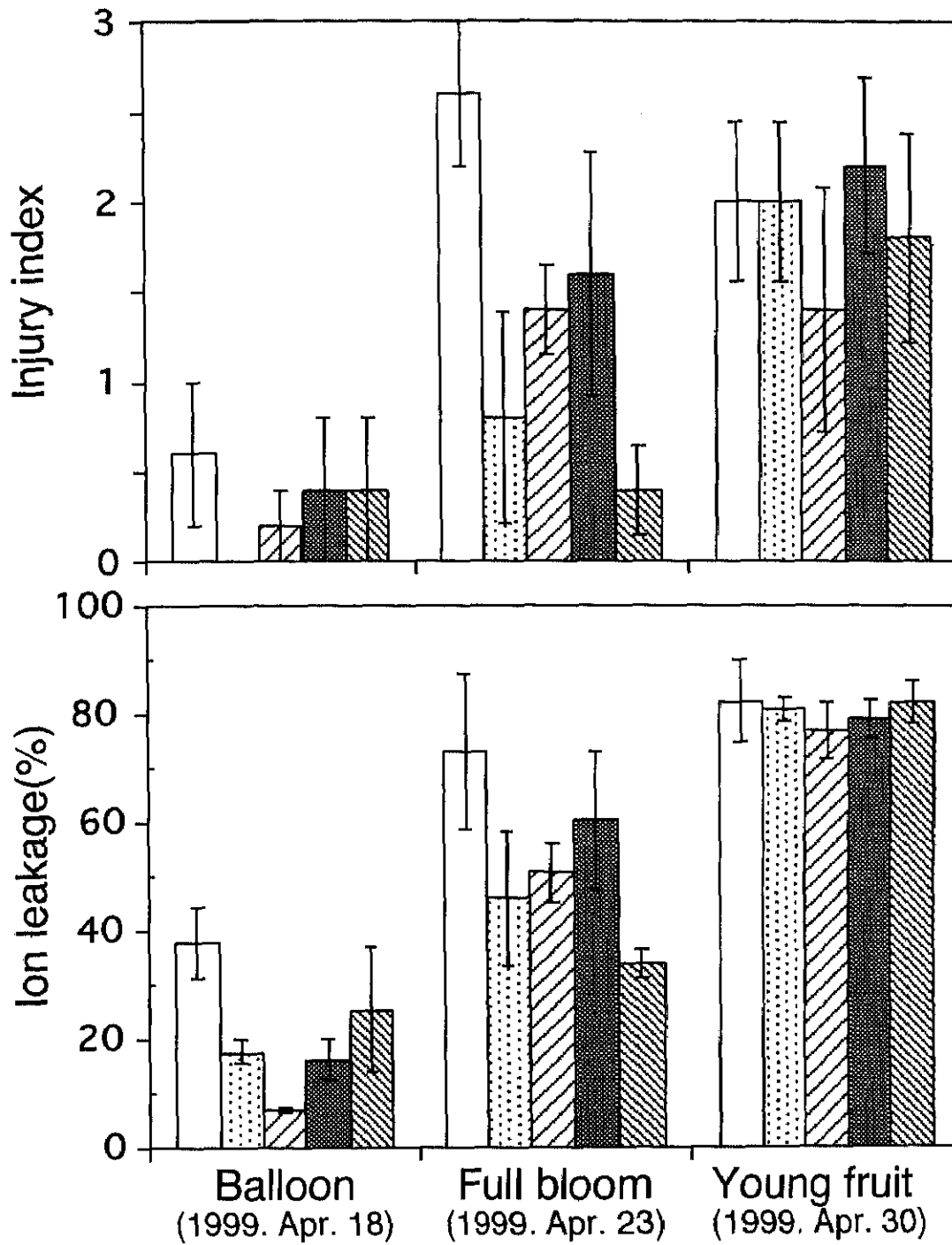


Fig. 31 . Injury index and ion leakage (%) of PDJ-treated florets of 'Kousui' exposed to -5°C for 1 h in 1999. Freezing injury was rated on a scale of 0 to 3 where 0=no injury, 1=ovule and pistil were damaged, 2= damage spread to receptacle and/or peduncle, 3= flower damaged completely. Vertical bars represent S.E. (n=6)



Table 4. Comparison of cold tolerance among different parts of 'Kousui' Japanese pear flower as expressed by ion leakage (%).

		Ion leakage (%)				
	Treatment	Petal	Stamen	Pistil	Receptacle	Peduncle
Balloon stage at -7. C	Cont.	35.7 ± 1.7	31.7 ± 4.0	62.3 ± 14.9	87.1 ± 11.9	80.2 ± 3.3
	PDJ 5ppm	19.1 ± 3.9 *	18.8 ± 2.1 NS	43.8 ± 7.5 **	74.5 ± 14.0 NS	76.5 ± 9.9 NS
Full bloom at -5. C	Cont.	22.4 ± 3.7	40.8 ± 8.1	31.9 ± 3.4	52.6 ± 10.4	40.0 ± 6.1
	PDJ 5ppm	21.1 ± 1.7 NS	28.2 ± 6.1 NS	26.8 ± 5.9 NS	22.3 ± 6.8 **	19.6 ± 3.2 *

NS, *, **. Nonsignificant or significant at P<0.05, 0.01 by Student's t-test. Petals, stamens, pistils, receptacles, and peduncle dissected from blooming flowers. Values are means of three replications ± SE.

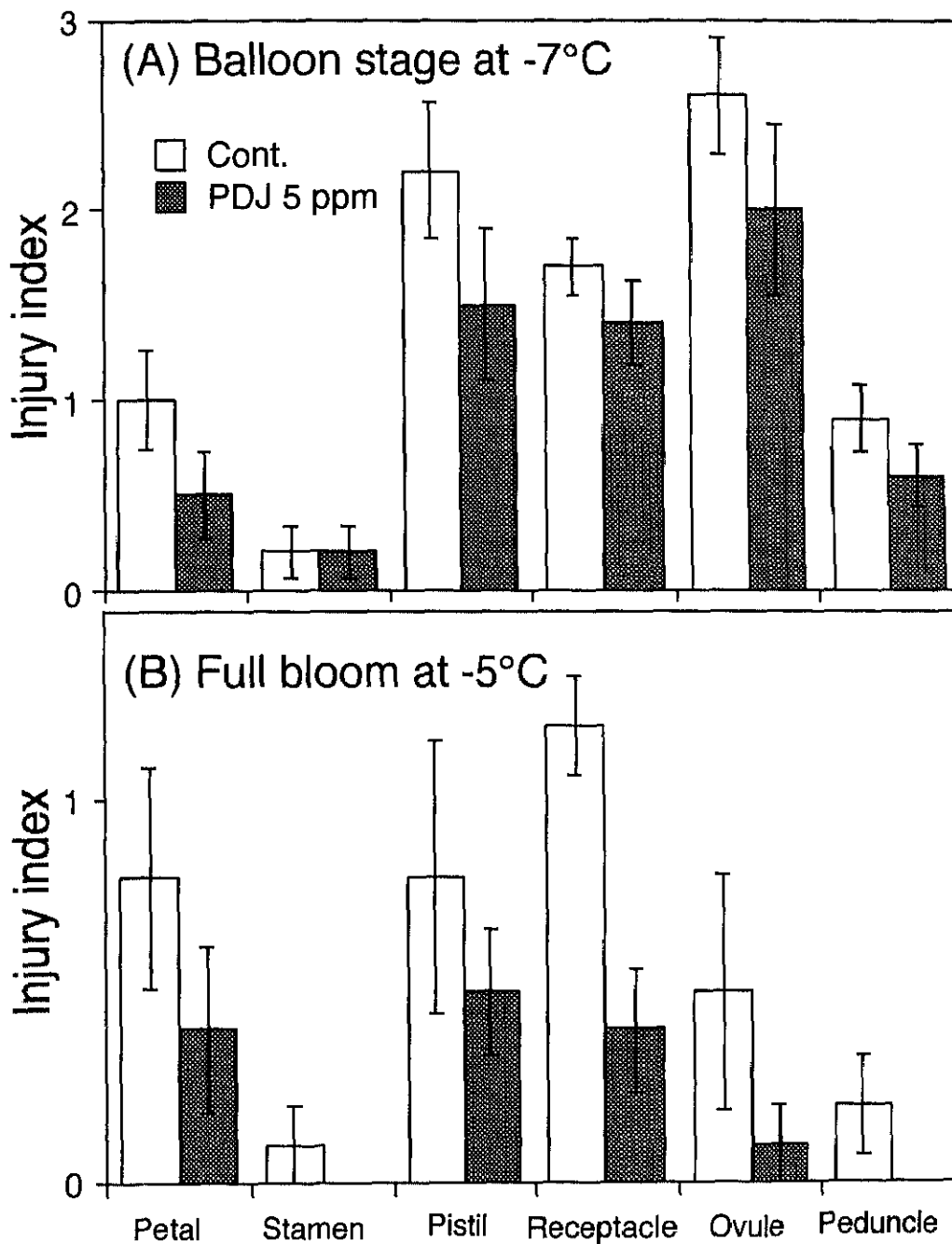


Fig. 32. Effects of PDJ-treatment on injury index of flower component organs; petals, stamens, pistils, receptacles(including sepals), ovule and peduncle of 'Kousui' in 2000. Florets at balloon stage were exposed to -7°C (A) and in full bloom to -5°C (B). Freezing injury was rated on a scale of 0 to 3 where 0=no injury, 1=water soaked and slight browning, 2= moderate browning, 3=the organ was completely damaged. Vertical bars represent S.E. (n=10)

Table 5. Effect of PDJ treatment on free amino acid content of 'Kousui' Japanese pear flower at balloon stage.

	Free amino acid content (μ M/g fresh wt.)					
	Flower			Peduncle		
	Cont.	PDJ 5 ppm		Cont.	PDJ 5 ppm	
Asparatic acid	3.22	2.33	*	2.69	3.18	NS
Glutamic acid	4.94	3.68	*	2.69	2.75	NS
Proline	4.84	8.82	*	0.16	0.23	**
Glycine	0.28	0.26	NS	0.99	0.29	*
Alanine	0.86	1.27	NS	1.64	0.77	*
Valine	0.81	0.65	NS	0.72	0.46	NS
Isoleucine	1.09	0.94	NS	0.57	0.27	NS
Phenylalanine	0.51	0.39	*	0.54	0.22	NS
Histidine	0.63	0.43	NS	0.43	0.15	NS
Lysine	0.16	0.11	NS	0.14	0.04	NS
Arginine	0.75	1.27	NS	0.24	0.14	NS
Total	18.09	20.15	NS	11.26	8.51	NS

NS, *, **. Nonsignificant or significant at $P < 0.05, 0.01$ by Student's t-test. Values are means of four replications.

Table 6. Effects of PDJ treatment on sugar content of 'Kousui' Japanese pear flower at balloon stage in 1999.

		Suger content (mg/g fresh wt)				
	Treatment	Fructose	Glucose	Sorbitol	Sucrose	Total
Flower	Cont.	0.20±0.06	0.28±0.05	0.79±0.14	3.99±0.76	5.27±0.98
	PDJ 5 ppm	1.08±0.28	2.49±0.51	6.81±0.17	20.56±3.99	30.93±4.59
		*	*	***	*	**
Peduncle	Cont.	0.22±0.04	0.37±0.07	2.64±0.36	5.69±1.74	8.16±2.34
	PDJ 5 ppm	0.49±0.13	1.86±0.41	4.54±1.32	11.08±3.56	17.97±4.32
		NS	*	NS	NS	NS

NS, *, **, ***. Nonsignificant or significant at $P < 0.05$, 0.01, 0.001 by Student's t-test. Values are means of four replications \pm SE.

Table 7 . Effects of PDJ treatment on sugar content of 'Kousui' Japanese pear flower in 2001.

	Treatment	Suger content (mg/g fresh wt)					Total
		Raffinose	Sucrose	Glucose	Fructose	Sorbitol	
Petal	Cont.	1.84 ±0.48	1.87 ±0.35	10.34 ±0.56	21.25 ±0.41	10.30 ±0.43	45.29 ±1.19
	PDJ 5 ppm	0.95 ±0.24	5.07 ±1.94	16.28 ±3.51	24.50 ±1.37	10.68 ±0.92	57.00 ±6.60
		NS	NS	NS	*	NS	NS
Stamen	Cont.	1.72 ±0.38	6.65 ±0.56	8.93 ±1.21	7.51 ±0.49	2.98 ±0.39	27.51 ±1.12
	PDJ 5 ppm	1.64 ±0.47	5.36 ±1.00	13.18 ±3.47	10.41 ±1.57	4.40 ±0.28	34.72 ±6.10
		NS	NS	NS	NS	*	NS
Pistil	Cont.	—	1.56 ±0.16	9.32 ±1.09	6.85 ±1.01	3.34 ±0.53	21.07 ±2.41
	PDJ 5 ppm	3.22 ±0.97	3.64 ±0.45	12.68 ±1.66	8.46 ±1.03	3.96 ±0.74	31.42 ±3.22
			*	NS	NS	NS	*
Sepal	Cont.	0.60 ±0.08	2.45 ±0.69	12.09 ±0.74	11.64 ±0.60	12.03 ±0.46	38.71 ±1.83
	PDJ 5 ppm	2.24 ±0.76	2.89 ±0.42	15.21 ±1.96	11.45 ±0.60	11.03 ±0.76	42.34 ±3.14
		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Receptacle	Cont.	0.69 ±0.21	3.31 ±0.42	7.10 ±0.43	6.37 ±0.78	5.21 ±0.34	22.46 ±1.23
	PDJ 5 ppm	0.81 ±0.15	4.84 ±0.75	14.20 ±1.65	8.49 ±1.01	6.27 ±0.28	33.54 ±2.37
		NS	NS	**	NS	*	**
Peduncle	Cont.	1.00 ±0.18	1.29 ±0.33	5.80 ±0.44	3.88 ±0.32	17.93 ±1.26	29.57 ±1.35
	PDJ 5 ppm	2.59 ±0.94	2.51 ±0.11	9.54 ±1.76	4.81 ±0.47	17.49 ±1.04	36.50 ±2.21
		NS	*	NS	NS	NS	*

NS, *, **. Nonsignificant or significant at P<0.05, 0.01 by Student' s t-test. Values are means of six replications ± SE.

Table 8. Effects of PDJ treatment on ABA content in 'Kousui' Japanese pear flower at different stages. Flower (petals, stamens, pistils, sepals and receptacle), fruit and peduncle were dissected from flower clusters.

Treatment	ABA content (ng/gF.W.)					
	Balloon (1999. 4.18)		Full bloom (1999. 4. 23)		Young fruit (1999. 4. 30)	
	Flower	Peduncle	Flower	Peduncle	Fruit	Peduncle
Cont.	-	144.1	-	520.3	1092.5	628.0
4/9 PDJ 5ppm	-	479.2	-	205.4	2081.2	665.8
4/9 PDJ 50ppm	-	1252.7	-	1141.5	784.4	426.2
4/15 PDJ 5ppm	-	770.8	-	904.3	1253.1	284.9
4/15 PDJ 50ppm	-	529.1	-	396.5	1444.1	328.4
Significance						
day	-	NS	-	NS	NS	*
concentration	-	NS	-	*	*	NS
day × concentration	-	**	-	**	**	NS

NS, *, **. Nonsignificant or significant at $P < 0.05$, 0.01 by ANOVA.

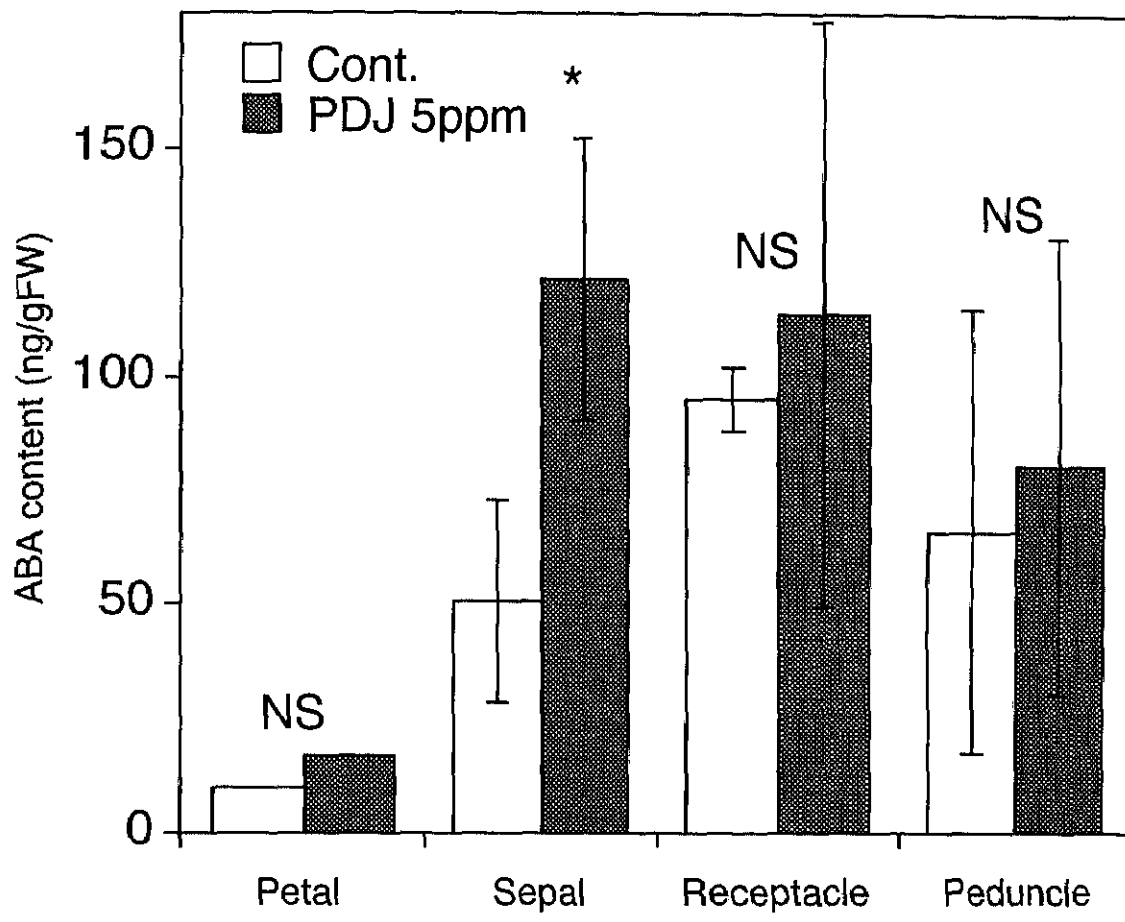


Fig. 33. Effects of PDJ-treatment on ABA contents of flower component organ; petals, sepal, receptacles, and peduncle of 'Kousui' in 2000. NS, *. Nonsignificant or significant at $P < 0.05$ by Student's t-test. Vertical bars represent S.D. ($n=3\sim5$)