

セイヨウナシの新梢における拡散性インドール-3-酢酸 (IAA) の分析

知野秀次¹・児島清秀^{1*}

(平成15年12月29日受付)

要約 本研究は、セイヨウナシ 'マルゲリット マリーラ' と 'ルレクチエ' の新梢における拡散性 IAA を測定し、水挿し法における新梢の切断面の更新の効果を調べた。拡散性 IAA は蛍光検出器を接続した HPLC により定量した。新梢の拡散性 IAA は季節で変化した。新梢における拡散性 IAA の量は、5月30日と9月23日にそれぞれ1.8、0.2 pmol/hour/g FW であった。5月30日の新梢当たりの流出量は、9月23日の9倍であった。対照区の新梢、枝区、葉区の拡散性 IAA の割合は水挿し後24時間で3:2:1で、枝区+葉区の拡散性 IAA 放出量の値は対照区の新梢の拡散性 IAA 量に一致した。拡散性 IAA の全流出量の約30%は、葉に由来することが示唆された。水挿しにおける新梢の切断面の更新により流出量の低下は抑制され、切断面の更新が有効であることを示した。

キーワード: 拡散性 IAA, IPA, HPLC, 新梢, セイヨウナシ

緒 言

木本植物における剪定は、樹木の休眠期に行なわれる^{17,18,22)}。果樹では、休眠期に行なわれる冬季剪定と新梢成長期に行う夏季剪定がある^{17,18,22)}。冬季剪定は、樹形の整形、枝葉と結果の均衡、隔年結果を防ぐことである^{17,18,22)}。夏季剪定は、受光の均一化・徒長枝の除去・結果枝の成長や結果の促進を目的として行なわれる^{12,13,17)}。夏季剪定は、冬季剪定に比べ樹勢衰弱効果が大きく、樹木の負担が大きい^{17,18,22)}。その特性を生かし、わい化栽培が行なわれている²⁾。しかし、成枝や成葉の剪定は、樹勢の衰弱を導くために慎重に行わなければならない^{17,18,22,23)}。

落葉果樹における植物ホルモンの研究は、植物成長調節物質の施与試験が精力的に行われ、特に、花芽の着生に関する試験がなされていた⁹⁾。以前に、リンゴ²¹⁾やニホンナシ^{3,4,5,6,7)}において報告がなされた。しかし、植物ホルモンと新梢成長の関係は、過去に報告が少なく、成長のメカニズムは十分には理解されていない。新梢成長は、芽生えで得られた結果から推察される場合が多い。また、剪定技術と植物ホルモンに関する報告も少ない。多くの剪定技術は、先人の試行錯誤により経験的に使われた。そのため、樹勢衰弱、枝葉と結果の不均衡、隔年結果を引き起こす場合がある。剪定は、豊富な経験が要求され、果樹の栽培管理の中で最も重要な技術とされている^{17,18,22)}。

本研究は、木本植物と植物ホルモンの関係を明らかにすることを目的として、セイヨウナシの新梢を用いて拡散性 IAA を定量した。また、新梢の葉の有無と拡散性 IAA の関係および切断面の更新の効果を試験した。

材料および方法

1. 植物材料

実験1と2では新潟大学農学部圃場にて植栽されているセイヨウナシ 'マルゲリット マリーラ' の新梢、実験3では知野氏(新潟県加茂市)の圃場で栽培されているセイヨウナシ 'ルレクチエ' の新梢を使用した。樹齢は、約12~15年の樹を選抜して使用した。

2. 採取方法

(1) 実験1 ('マルゲリット マリーラ' の新梢における拡散性 IAA の定量)

実験は新梢成長期である2000年5月31日に実施した。30cm 以上の新梢を、4本の樹木から各1本ずつ、計4

¹自然科学研究科

*代表者: 新潟大学大学院自然科学研究科 kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp

本を選抜した。それぞれの新梢は、葉を残したまま頂芽から20cmの位置で切断した。その後、速やかに植物材料の新梢の重さと切断面を計測した。新梢の調整終了後、切断面の不純物を除去するために蒸留水に水挿しした(5分間)。その後、蒸留水を捨て、新しい蒸留水をビーカーに50ml注ぎ、水挿しにしてインキュベーターに入れた。インキュベーターは、温度25℃、照度は約5000Lux、24時間照明に設定した。蒸留水の採取は、24時間後に行った。採取した蒸留水は、植物ホルモンの抽出・精製まで冷凍保存した。

(2) 実験2(‘マルゲリット マリーラ’の新梢における葉の有無による拡散性 IAA の分析)

実験は新梢の第二次伸長が停止した2000年9月23日に実施した。試験区は、葉を全て取り除いた枝(Branch区)、枝区についていた全葉(Leaf区)、対照区として葉が付いた新梢(Shoot区)の3区を設定した。30cm以上の新梢を4本の樹から各5本ずつ計20本を無作為に選び、印を付けた。枝区は、10本の新梢を使用し、葉を全て取り除き、頂芽から20cmの位置で切断した(Fig. 1)。葉区は、枝区で除去した全葉を利用した。対照区として、葉を付けたままの10本の新梢を20cmに調整した。その後、速やかに枝と葉の重さと切断面を計測した。枝の調整終了後の処理とインキュベーターの設定は、実験1と同様に行った。蒸留水の採取は、24・48・72・96時間後に行い、分析まで冷凍保存した。

(3) 実験3(‘ルレクチエ’の新梢における切断面の更新の効果)

実験は、新梢の第二次伸長が停止した2001年9月23日に実施した。試験区は、蒸留水の採取時に切断面を更新した新梢とそのままの新梢の2区を設定した。30cm以上の新梢を10本の樹から各2本ずつ計20本を無作為に選び、印を付けた。各試験区に10本の新梢を使用し、蒸散を防ぐために葉を全て取り除き、頂芽から20cmの位置で切断した。その後の処理は、実験1・2と同様に行った。蒸留水の採取と切断面の厚さ約2mmの切除は、6・12・18・24時間後に行った。

3. 抽出・精製

過去に児島らによって報告されたホルモン分析の抽出・精製法を参考にした^{11,12,13,14,15)}。各サンプルに、内部標準として適量のインドールプロピオン酸(IPA)を添加した。0.2 μ mのメンブレンフィルターでろ過後、ロータリーエバポレーターで50ml程度に減圧濃縮した。濃縮した蒸留水(水層)を再度ろ過し、希塩酸を使用してpH2.8に調整した。その後、水層と等量のジエチルエーテルで分配抽出を2回した。回収したジエチルエーテル層は、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。その後、残渣を50%メタノールで3回溶かし、試験管に集めた。

4. 分析

分析は、児島ら拡散性 IAA の分析の報告を参考にした^{11,12,14,15)}。IAA の定量は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と蛍光検出器(L-7480; HITACHI)を用いて行った。カラムは、Inertsil ODS-3(5 μ m, 6.0 I.D. \times 250 mm; GL Sciences Inc)を使用した。溶離液は、30%と40%メタノール(+20mM 酢酸)に設定した^{11,12,14,15)}。

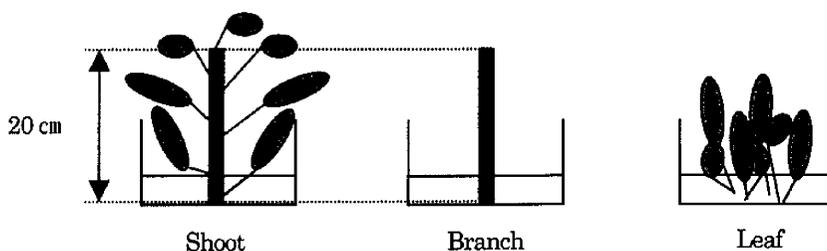


Fig.1. Method of immersing in water

結果および考察

実験1で使用した切片の重さと切断面の大きさを Table 1 に示す。セイヨウナシ ‘マルゲリット マリーラ’の新梢における拡散性 IAA の定量の結果、5月下旬の新梢の拡散性 IAA の量は、24時間後に118 pmol/shoot を検出した。拡散性 IAA は、時間あたりの流出量は4.9 pmol/hour/shoot であり、生重量あたりの流出量は1.8 pmol/hour/g FW であった。

Table 1. Values of fresh weight and cut surface of plant material from shoots of pear 'Marguerite Marillat'

		Fresh weight		Cut surface of shoot	
		g	g/shoot	Diameter (mm/shoot)	Area size (mm ² /shoot)
Experiment 1	Shoot	11.0	2.8±0.2	4.7±0.1	68.1±3.8
Experiment 2	Shoot	88.7	8.9±0.7	5.5±0.3	95.3±9.4
	Branch	52.5	5.6±0.5	5.6±0.3	99.0±9.2
	Leaf	42.2	4.2±0.3	—	—

Values are means ± S.E (n=4) in Experiment 1 and ± S.E (n=10) in Experiment 2.

実験2のセイヨウナシ 'マルゲリット マリーラ' の新梢における葉の有無による拡散性 IAA の測定結果を Table 1、Fig. 2 と Fig. 3 に示した。新梢 (20cm) あたりの葉数は、Leaf 区が9.7±0.5 枚/切片であり、Shoot 区もほぼ同じであった (データなし)。拡散性 IAA の流出量は、Shoot 区は■、Branch 区は□、Leaf 区は▲で示した (Fig. 2)。9 月下旬の新梢における拡散性 IAA の時間あたりの流出量は、Control 区 (1.8 pmol/hour/shoot)、Branch 区 (1.2)、Leaf 区 (0.4) の順であった (Fig. 2)。拡散性 IAA の流出量は、Shoot 区と Branch 区は 0～24 時間で高い値を示し、24 時間後に著しく減少した。以前の報告で、芽生えにおける IAA の輸送速度は約 1 cm/hour であることが示された。木本植物の輸送速度が同程度であれば、本実験で使用した 20cm の新梢の頂芽で生合成された IAA は、20 時間後に切断面に到達することになる。また、新梢を樹上から切断し、頂部における IAA の生合成が停止した場合は、20 時間後に枯渇することになる。Leaf 区は、他区に比べ放出量が少量であったが、72 時間までほぼ同量が検出された。枝は IAA や同化物の輸送器官であるが、葉は光合成器官でありエネルギー源の供給が可能である。拡散性 IAA の流出量の経時変化による減少は、各器官の役割の違いにより生じたと考えられる。また、以前に、オーキシンの生合成や輸送にエチレンが関与しているとの報告があり^{19,20)}、植物材料から生成されるエチレンにより阻害されたかもしれない^{16,19)}。今後、拡散性 IAA の流出とエチレンの関係を明らかにするためにも、エチレンの測定が必要である。

拡散性 IAA の積算値を Fig. 3 に示し、Branch 区と Leaf 区の積算値の和を■で表した。Shoot 区と Branch 区の拡散性 IAA の積算値は、24 時間後から 96 時間後までほぼ同じ傾向を示し、増加しなかった。Leaf 区の IAA 量は、96 時間後まで増加し Branch 区と同程度になった。拡散性 IAA の積算値の割合は、24 時間後の測定結果で約 3 : 2 : 1 (Shoot 区 : Branch 区 : Leaf 区) であった。また、Branch 区と Leaf 区の拡散性 IAA 量の和と Shoot 区の拡散性 IAA 量の積算値は、48 時間後までほぼ同レベルであった (Fig. 3)。これらの結果は、拡散性 IAA の全流出量の約 30% が葉で生合成された IAA に依存することを示している。よって、新梢の成熟葉は、IAA の重要な生合成器官であると考えられる^{1,2)}。

5 月下旬と 9 月下旬のセイヨウナシ 'マルゲリット マリーラ' の新梢を比較すると、20cm あたりの生重量は約 8 倍に成長した (Table 1)。実験 1 と実験 2 の Shoot 区を比較した場合、拡散性 IAA の時間あたりの流出量は、5 月下旬 (4.9 pmol/hour/shoot) は 9 月下旬 (1.8) の 2.7 倍であった。 (Table 1、Fig. 2)。24 時間後の拡散性 IAA の積算値も、5 月下旬 (117 pmol/shoot) は 9 月下旬 (43.8) の約 2.7 倍であり、時間あたりの流出量と同様の結果であった。さらに、生重量あたりの拡散性 IAA の流出量は、5 月下旬 (1.8 pmol/hour/g FW) は 9 月下旬 (0.2) の 9 倍であった。拡散性 IAA の流出量の差から、新梢における IAA の生合成は、栄養蓄積期の 9 月下旬より新梢成長期の 5 月下旬において活発であることが示唆される。

実験 3 のセイヨウナシ 'ルレクチェ' の新梢における切断面の更新の効果の結果を Fig. 4 に示した。9 月下旬の 'ルレクチェ' の新梢を使用し、拡散性 IAA を測定した。各区の新鮮重は、Table 2 に示した。拡散性 IAA の 6 時間後の時間あたりの流出量は、Control 区で 2.0 pmol/hour/shoot、Cut (切断面の更新) 区で 2.2 であり、ほぼ同様の結果であった。しかし、24 時間後の拡散性 IAA の時間あたりの流出量は、Control 区で 0.5 pmol/hour/shoot、Cut (切断面の更新) 区で 1.6 であり、約 3 倍の差が生じた。拡散性 IAA 量の積算値は、24 時

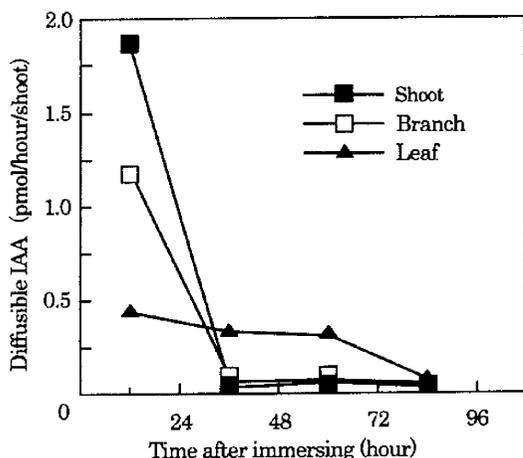


Fig. 2. Changes in concentration of diffusible IAA in shoot (branch + leaf), branch and leaf on pear 'Marguerite Marillat' (2000, Sep). 'Shoot' was untreated and had branch and leaves. Ten shoots were divided into branches and leaves, which correspond 'Branch' and 'Leaf', respectively.

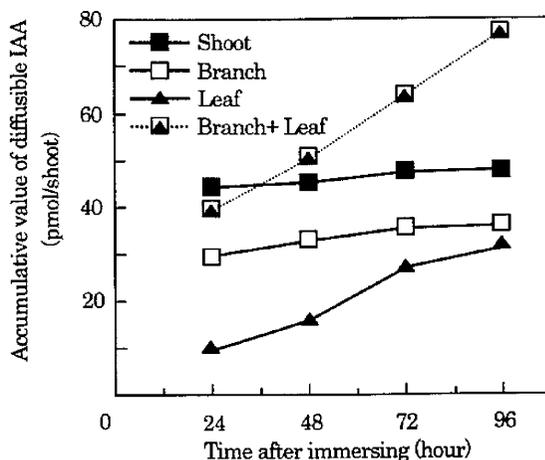


Fig. 3. Changes in accumulative value of diffusible IAA in shoot of pear 'Marguerite Marillat' (2000, Sep). Values of 'Branch+Leaf' (▲) were calculated by adding values of 'Branch' to values of 'Leaf'.

間後に Control 区で30pmol/shoot、Cut 区で47あり、Cut 区は Control の区1.5倍であった。この結果は、切断面の更新が有効であることを示している。拡散性 IAA の流出量は、両処理区で18時間後に減少したが、Cut 区の拡散性 IAA の流出量は Control 区より高い値を示した。この原因は、切断面の老化の影響であり、更新によって低減されると考えられる。しかし、12時間後以降の切断面の更新は、拡散性 IAA の流出量の減少を避けることはできない。それは、組織・器官自体の劣化や他の要因の影響かもしれない。

今日において、拡散性 IAA の報告は抽出性 IAA の報告に比べて少ない。また、草本性植物を利用した拡散性 IAA の報告^{10,13)} よりも、木本性植物の報告^{7,16)} が少ない。本研究は、木本性植物の新梢を利用し、新梢成長期と養分蓄積期の新梢における拡散性 IAA の動向と新梢の各器官における拡散性 IAA の流出量の割合を示した。しかし、夏季剪定を改良するためには情報が不足している。例えば、IAA と拮抗作用を持つサイトカイニンの動向、拡散性 IAA と新梢成長の関係、季節変化における拡散性 IAA の動向などの試験が必要である。整枝・剪定の基礎的技術は、植物ホルモンと植物生長の解明により、機構の解明や改良が可能となると考えられる。また、本研究は、拡散性 IAA の定量法である水挿し法を切断面の更新技術により改善した。この改善で、より無傷植物に近い値の算出ができると考えられる。

Table 2. Values of fresh weight and cut surface of plant material in Experiment 3.

	Fresh weight		Cut surface of shoot	
	g	g/shoot	Diameter (mm/shoot)	Area size (mm ² /shoot)
Control	26.5	2.7 ± 0.2	4.0 ± 0.2	49.2 ± 3.9
Cut	25.3	2.5 ± 0.1	3.8 ± 0.1	45.4 ± 2.4

Values are means ± S.E (n=10).

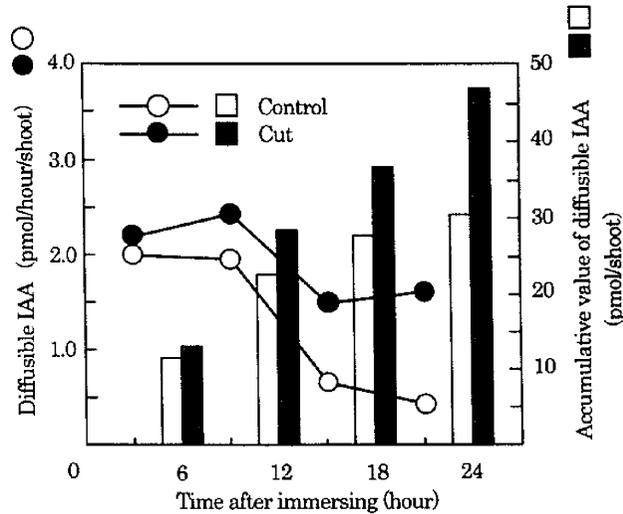


Fig. 4. Changes in values and accumulative value of diffusible IAA by the renewal of cut surface in shoots of pear 'Le Lecrier' (2001, Sep).

謝 辞

本研究において、分析機器の管理をして頂いた村田憲昭氏、新潟大農学部圃場の管理作業を補助して頂いた桜井紅葉・千田佑子氏、植物材料を提供して頂いた知野 栄氏、ならびに試験の補助をして頂いた園芸研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

引用文献

- (1) Borkovec, V., Didehvar, F. and Baker, D. A. 1994. The biosynthesis and translocation of [14 C] IAA in *Ricinus communis*. *Plant Growth Regulat* 15:137-141.
- (2) Gambridge, A. P. and Morris, D. A. 1996. Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin pathway in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 199:583-588.
- (3) Banno, K., S. Hayashi, and K. Tanabe. 1986. Morphological and histological studies on flower bud differentiation and development in Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *J.Jpn.Soc.Hort.Sci* 55:258-265.
- (4) Ito, A., H. Yaegaki, H. Hayama, S. Kusada, I. Yamaguchi, and H. Yoshioka. 1999. Bending shoots stimulates flowering and influences hormone levels in lateral buds of Japanese pear. *Hort Science* 34(7):1224-1228.
- (5) Ito, A., H. Hayama, and H. Yoshioka. 2000. Effects of plant growth regulators and their time of application on flower bud formation of Japanese pear 'Kousi'. *J.Japan.Soc.Hort.Sci* 69(5):529-535.
- (6) Ito, A., H. Hayama, and H. Yoshioka. 2001. The effect of shoot-bending on the amount of diffusible indole-3-acetic acid and its transport in shoots of Japanese pear. *Plant growth regulation* 34:151-158.
- (7) Ito, A., H. Hayama, Y. Kashimura, H. Yoshioka. 2001. Effect of maleic hydrazide on endogenous cytokinin contents in lateral buds, and its possible role in flower bud formation on the Japanese pear shoot. *Scientia Horticulturae*. 87:199-205.
- (8) 伊東明子. 2000. 果樹の新技术新発見 日本ナシの花芽着生率を高める植物成長調節剤. *果実日本*. 55(6):75-77.
- (9) 伊東明子. 1999. 果樹の基礎生理23 落葉果樹の剪定と植物ホルモン. *果実日本*. 54(12):63-65.
- (10) 菊地寛子・太田祐樹・児島清秀. 2003. 園芸作物からの拡散性 IAA の分析. *新潟大学農学部報告*. 56(1):9-15.
- (11) Kojima, K. 1995. Simultaneous measurement of ABA, IAA and Gas in citrus - role of ABA in relation to sink ability. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 29:170-185.

- (12) Kojima, K. 2001. Characteristics of HPLC columns and mass spectra of LC-MS for phytohormone analysis. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 35(3):149-154.
- (13) Kojima, K., E. Ohtake., Z. Yu. 2002. Distribution and transport of IAA in tomato plants. *Plant growth regulation* 00:1-6.
- (14) 児島清秀・鈴木さより・韓 東生. 2000. 植物ホルモンの分析に用いる HPLC カラムの諸特性. *新潟大学農学部報告*. 53: 9-16.
- (15) 児島清秀・村田憲昭・MIN Wei・千田佑子・付 立新. 2002. 植物ホルモンの分析のための HPLC カラムの半値幅など特性. *新潟大学農学部報告*. 54巻2号 :109-114.
- (16) Lieberman M and Knecht E. 1977. Influence of ethylene on indole-3-acetic acid concentration in etiolated pea epicotyl tissues. *Plant Physiol* 60:475-477.
- (17) 能代克巳・鈴木鐵男. 1994. 新版図集果樹栽培学の基礎知識. 農山村文化協会.
- (18) 能代克巳他. 2000. 農学基礎セミナー果樹栽培の基礎. 農山村文化協会.
- (19) Riov J, Dror N and Goren R. 1982. Effect of ethylene on [¹⁴C] indole-3-acetic acid metabolism in leaf tissue of woody plants. *Plant Physiol* 70:1265-1270.
- (20) Robitaille, H.A. and C Leopold. 1974. Ethylene and the regulation of apple stem growth under stress. *Physiol. Plant*. 32:301-304.
- (21) Sanyal, D. and F. Bangerth, 1998. Stress induced ethylene evolution and its possible relationship to auxin-transport, cytokinin levels, and flower bud induction in shoots apple seedlings and bearing apple trees. *Plant Growth Regulat.* 24:127-134.
- (22) 杉浦 明 他. 1991. 新果樹園芸学. 朝倉書店.
- (23) 鈴木和夫. 2000. 樹木医学. 朝倉書店.

Analysis of Diffusible Indole-3-acetic acid (IAA) in Shoots of Pear

Shuji CHINO¹ and Kiyohide KOJIMA^{1*}

(Received Dec. 29, 2003)

Summary

In this study, diffusible Indole-3-acetic acid (IAA) in shoots of pear 'Marguerite Marillat' and 'Le Lectier' was measured and the effect of renewal of cut surface of a shoot in 'method of immersing in water' was examined. Diffusible IAA was estimated by high-performance liquid chromatography (HPLC) connected with a fluorescence detector. Amount of diffusible IAA in shoots changed in the season. Amount of diffusible IAA in shoots were estimated 1.8 and 0.2 pmol/hour/g FW on May, 30 and Sep, 23, respectively. The amount of diffusible IAA from shoots on May 30 was nine times as that on Sep 23. Ratio of Amounts of diffusible IAA in shoots of 'Shoot', 'Branch' and 'Leaf' became 3:2:1 respectively during 24 hour after immersing in water. The outflow amount of diffusible IAA in 'Branch+Leaf' was agreed with that of outflow of diffusible IAA in 'Shoot' (control). It is suggested that about 30 % of total outflow amount of diffusible IAA from 20 cm long shoot may depend on leaves. Decline of outflow amount of diffusible IAA in 'method of immersing in water' was suppressed by renewal on cut surface of shoot, and it showed validity of the technique.

Key words: diffusible Indole-3-acetic acid, Indole-propionic acid, HPLC, shoot, pear

¹ Graduate School of Sciera and Technology, Niigata University

* Corresponding author : kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp