

リンゴの早期落果とサイトカイニン及びジベレリンとの関係

福井博一・今河 茂・田村 勉

北海道大学農学部 060 札幌市北区

Relation between Early Drop of Apple Fruit, Cytokinin and Gibberellin

Hirokazu FUKUI, Shigeru IMAKAWA and Tsutomu TAMURA

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

Summary

Cytokinin and gibberellin activity in apple seeds and fruit flesh was investigated in relation to early drop of fruit. The early drop of 'McIntosh Red' apple fruit was enhanced by high night temperatures (25°C) given for 30 days beginning on the 10th day after full bloom. The diameters of 1200 central fruits on two trees were measured at the same point every other day to determine the onset of reduced rate of fruit enlargement, which was used to identify the potential drop fruit. Persistent fruit and potential drop fruit were collected and extracted with ethanol. An acid ether fraction and a *n*-butanol fraction were obtained from the ethanol extract. Activities of plant growth regulators in each fraction were bioassayed. It was found that zeatin- and zeatinriboside-like substances existed in the seed as cytokinin and that these plus an undefined cytokinin-like substances were found in the fruit flesh. Cytokinin activity in the seed was high, 40 to 70 times that in the fruit flesh. It was presumed, therefore, that the biosynthesis of cytokinin occurred in the seeds. Cytokinin activity in the seeds of potential drop fruit showed a value 1/15 to 1/40 that of persistent fruit. This may indicate that a decline in cytokinin activity is closely related to the early drop of fruit. GA₃ and GA₄₊₇ existed as gibberellins in the seeds. Gibberellin activity in seeds of the potential drop fruit was lower than that of persistent fruit. A decline in gibberellin activity may also be related to the early drop of fruit.

緒 言

果実の発育と種子数との間には密接な関係があり、種子数の少ないものは落果しやすい傾向が認められることはよく知られた事象であって(17), その種子では生長調節物質が合成され、それらが果実の発育を制御していると言われている。

前報(7)で、その中のオーキシシンについては早期落果との関連性が低いことを報告した。Murneek(15)は胚の発育と早期落果に関する報告の中で、胚への養分供給組織としての胚乳に着目し、早期落果は胚乳の発育不全によって発生するのであろうと述べている。また、この組織ではサイトカイニンやジベレリンが生成されていると言われている(2, 18)。サイトカイニンは果肉組織の細胞分裂を制御する植物ホルモンであることが報告されてお

り(10)、早期落果が発生する果実発育初期において重要な役割を果たす物質であると考えられる。しかし、サイトカイニンと早期落果との関係についての報告は極めて少なく、この生長調節物質の落果に及ぼす影響についてはほとんど論議されていない(9)。ジベレリンに関しては、早期落果を促進する物質であるとする報告もあるが(9)、他方、早期落果を抑制する効果も認められている(20)。そこで本研究では、早期落果とサイトカイニン及びジベレリンとの関係を明らかにするためにこの両物質の果実及び種子内の活性について調査した。

材料及び方法

北海道大学農学部附属農場に栽植されている11年生の「旭」2樹を用い、1982年に早期落果を促すために前報(7)で述べた方法によって夜間加温処理を行った。2樹のすべての短果枝の中心果、計1200個にラベルを付し、夜間加温処理開始後2日ごとに同一部位の果径を測定し

¹ 1985年4月19日 受理

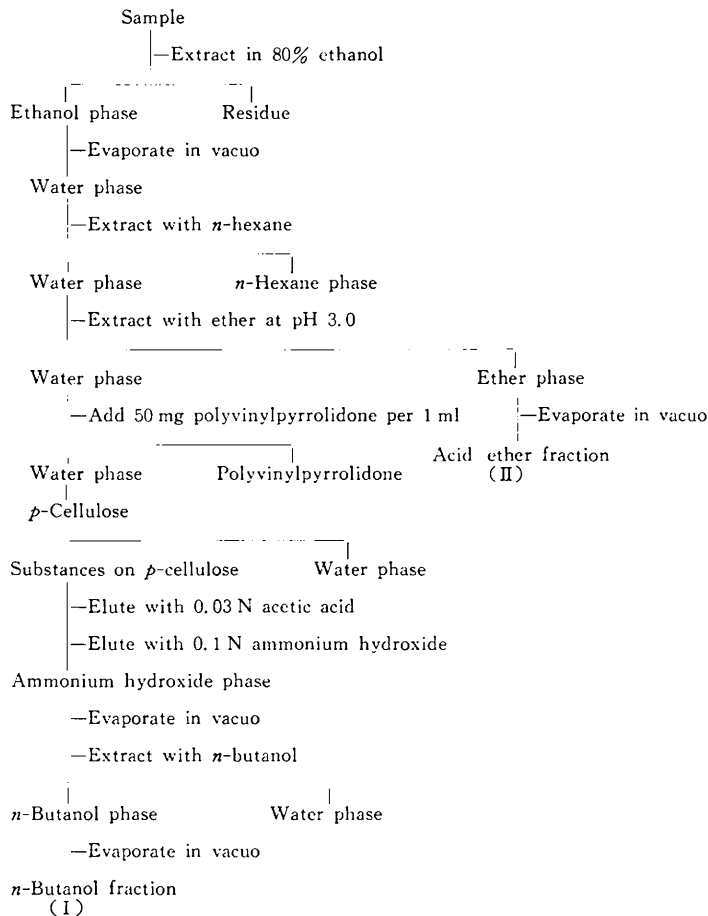


Fig. 1. Fractionation of growth regulators.

て将来落果すると予想される果実（落果判定果：potential drop fruit）を判別した(7)。落果判定果はすべて採取し、種子を取り出して果肉組織とともに -30°C のフリーザーに保存した。同時に、2日間で2.2 mm以上の果径増加が観察される正常果も採取し、種子を取り出し果肉組織とともにフリーザー内に保存した。

サイトカイニン及びジベレリンの抽出及び精製は第1図に示す方法に従い、酸性エーテル画分(II)と *n*-ブタノール可溶性画分(I)を得た。I及びIIの各画分はいずれも 30°C で減圧濃縮し、Iの画分はサイトカイニン活性の測定用、IIの画分はジベレリン活性の測定用に割り当てた。

Iの画分の成分は、Sephadex LH-20のカラムクロマトグラフィーを用いて35%エタノールで溶出させ分離した。溶出液は12 ml ずつ分取し、サイトカイニンを定量した。定量法はMiller(12)の方法に従い、ダイズ(品種‘Acme’)のカルス生長を用いる生物検定法を用いた。

IIの画分の成分は、シリカゲル薄層クロマトグラフィーを用いて精製した。薄層は厚さ0.25 mmのシリカゲル60(Merk社製)を用い、酢酸エチル：クロロホルム：酢酸(15:5:1)で展開した。展開後薄層を10等分し、シリカゲルを削り取った後、50%アセトン10 mlで溶出し、イネ品種‘短銀坊主’を用いた矮性イネ検定法(14)を用いてジベレリンの定量を行った。

結 果

正常果と落果判定果について、それぞれの種子エタノール抽出物から得られた *n*-ブタノール画分(I)のサイトカイニン活性を調べた結果を第2図に示した。正常果、落果判定果ともに溶出量120~180 mlの高い活性をもつ物質(CSI)及び240~300 mlの間に高い活性をもつ物質(CS II)の2つの物質が存在した。標準物質としてゼアチンリボシドとゼアチン(共にMerk社製)を用いて同様にクロマトグラフィーを行った結果、前者が150 ml前後、後者が270 ml前後で溶出された。したが

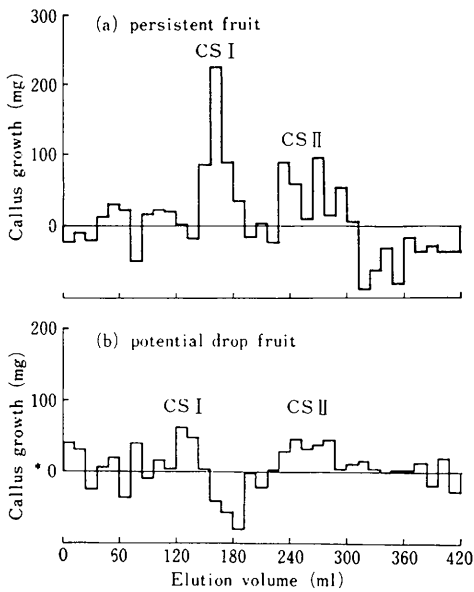


Fig. 2. Cytokinin activity bioassayed with soybean callus growth after the Sephadex LH-20 fractionation of a *n*-butanol fraction from seeds.

* callus growth in blank fraction before elution

って、CS Iはゼアチンリボシド、CS IIはゼアチンにそれぞれ近い物質であると推定された。正常果のCS IとCS IIの活性は落果判定果のそれより高かった。

第3図は前記と同様の調査を果肉組織について行った結果である。正常果、落果判定果ともに種子の場合と同様、ゼアチンリボシド及びゼアチンの溶出量に近い値を持つ物質CF IとCF IIの存在が認められた。さらに、CF IIが溶出された後にサイトカイニン活性を持つ物質CF IIIが検出され、果肉組織中には以上の3種類のサイトカイニン様活性物質が認められた。

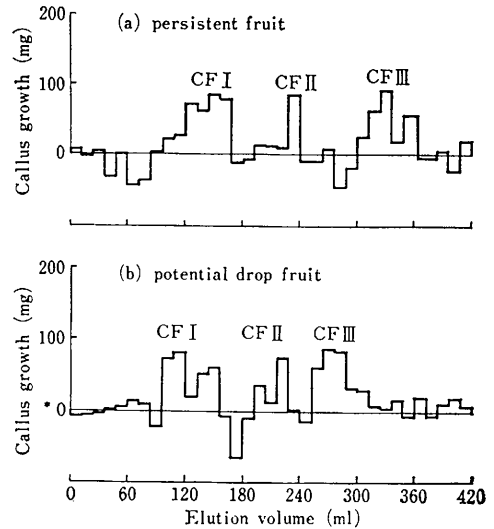


Fig. 3. Cytokinin activity bioassayed with soybean callus growth after the Sephadex LH-20 fractionation of a *n*-butanol fraction from fruit flesh.

* callus growth in blank fraction before elution

ゼアチンリボシド及びゼアチンの標準試薬を用いて、ダイズカルスの各々に対する検量線を作製し、種子及び果肉組織のゼアチンリボシド当量及びゼアチン当量を算出したものが第1表である。落果判定果の種子数は正常果のそれより少なかった。正常果の果肉組織に対する種子のゼアチンリボシド及びゼアチン当量の比は、果実当たりの値では0.15、0.16と小さかったが、生重当たりの値は45、173と極めて大きな値を示した。このように、果実内のサイトカイニンは1果当たりの総量では果肉組織の方が多いが、その組織内濃度は種子の方が著しく高かった。正常果の落果判定果に対する比は、種子ではゼアチンリボシドが30~40前後、そしてゼアチンが10~20前

Table 1. Cytokinin activity in the seed and fruit flesh of persistent fruits and potential drop fruits.

		No. of seed	fruit weight	zeatine riboside EQ. (μ M)			zeatine EQ. (μ M)		
				per 100g fresh weight	per 1000 seeds	per fruit	per 100g fresh weight	per 1000 seeds	per fruit
persistent fruit	seed	8.6	—	5.9×10^{-1}	6.9×10^{-3}	6.1×10^{-5}	3.3×10^{-1}	3.9×10^{-3}	3.5×10^{-5}
	fruit flesh	—	3.0 (g)	1.3×10^{-2}	—	3.9×10^{-4}	1.9×10^{-3}	—	5.7×10^{-5}
	seed/fruit flesh	—	—	45	—	0.15	173	—	0.61
potential drop fruit	seed	6.8	—	2.2×10^{-2}	2.1×10^{-4}	1.4×10^{-6}	2.4×10^{-2}	2.3×10^{-4}	1.6×10^{-6}
	fruit flesh	—	2.2 (g)	6.8×10^{-3}	—	1.5×10^{-4}	1.8×10^{-3}	—	4.0×10^{-5}
persistent fruit/potential drop fruit	seed	—	—	27	33	43	14	17	22
	fruit flesh	—	—	1.9	—	2.6	1.0	—	1.4

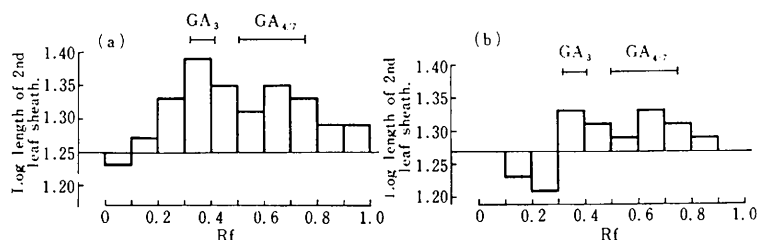


Fig. 4. Histograms of gibberellin activity in acid ether fraction from seeds after TLC development with ethyl acetate:chloroform:acetic acid (15:5:1).
(a) persistent fruit (b) potential droup fruit

後と大きな値を示したのに対し、果肉組織では前者が2.0、後者が1.0前後と小さかった。

種子エタノール抽出物の酸性エーテル可溶性画分(II)の物質をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで分離し、矮性イネ検出法によりジベレリン活性を調べ、ヒストグラムに示したのが第4図である。正常果及び落果判定果ともに Rf 0.3~0.4 前後の区分と Rf 0.6~0.7 前後の区分に活性を持つ物質 GS I と GS II が認められた。標準物質として GA₃ と GA₄₊₇ (ともに協和発酵社製)を用い、同様にシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行い、エタノール:濃硫酸(95:5)を噴霧し、120℃で加熱後、紫外線照射下の蛍光によりそれらを検出して Rf を求めた結果、GA₃ が0.32~0.41、GA₄₊₇ が0.50~0.75であった。したがって、種子エタノール抽出物の酸性エーテル可溶性画分(II)のシリカゲル薄層クロマトグラム上の GS I と GS II は、それぞれ GA₃ と GA₄ 又は GA₇ であると推定した。落果判定果のジベレリン様活性は、正常果のそれと比べて著しく低かった。

考 察

Letham and Williams(11) はリンゴ果実中のサイトカイニン活性物質について調査し、3~4種類のサイトカイニンが存在すると報告している。これによると、これらのうちゼアチン、ゼアチンリボシド、ゼアチンリボシドの3種類が同定されている(11)。本実験においても同様に果肉組織で3種のサイトカイニン様物質が認められ、そのうち2種についてはそのカラム保持時間から、ゼアチンとゼアチンリボシドであると推測される。しかし、他の1種については本実験では明らかにすることはできなかった。また、種子ではゼアチンとゼアチンリボシドの2種類のサイトカイニンの存在が認められたが、Letham and Williams(11)の結果とは異なりゼアチンリボシドに相当する物質は確認できなかった。

第1表に示すように、正常果の果実当たりの種子のサイトカイニン活性は、果肉組織のそれと比べて低く、1

果当たりの総量では果肉組織の方が多かった。しかし、生重当たりの種子のサイトカイニン活性は、ゼアチンリボシドで約45倍、ゼアチンで約170倍と極めて高い値を示した。したがって、種子組織は果肉組織と比べ1果に占める重量比(容積比)が著しく小さいため、1果当たりのサイトカイニン活性の総量では低いもののその組織内濃度は極めて高いことが明らかとなった。未熟種子は種々の生長調節物質の合成の場であると言われている(17)ことから、この種子における高濃度のサイトカイニンの存在は、これが種子内で合成されていることを示すものと推測される。また、この時期の種子は胚が小さく(6)、ほとんどが胚乳と珠心で占められていることから、サイトカイニンはこれらの組織で主に合成され则认为られる。

Williams and Letham(21)はサイトカイニンが単為結果を誘発しその発育を促進することから、サイトカイニンはリンゴの着果及び発育を制御する物質の1つであると述べている。第1表に示すように、落果の引き金がかかれた直後の状態である落果判定果の種子のサイトカイニン活性は、正常果と比較して著しく低く、種子でのサイトカイニン活性の低下が早期落果と密接に関係することが推測された。サイトカイニンは果肉組織の細胞分裂を促す作用を持つことが知られており(10)、早期落果が発生する時期は果実の細胞分裂期と一致している(19)。また、筆者ら(6)は果実の樹体からの離脱に先立ち果実の発育が衰えることを観察している。したがって、種子のサイトカイニン活性の低下によって果肉組織の細胞分裂能が低下し、果実の発育が衰えることが早期落果の1要因となっている可能性が大きい。

Murneck(15)は早期落果と関連の深い組織として胚乳組織を挙げ、ここで合成される生長調節物質が落果を制御しているのであろうと考察しており、前述のサイトカイニンの役割についての考察はこれと一致している。胚乳組織はサイトカイニンのほかにジベレリンを合成す

ることが知られており(2), この生長調節物質も幼果の発育に重要な役割を果たしている(16)。

果肉組織中には GA_3 が存在することが知られているが(8), その活性は種子のジベレリンの3000分の1と低く、ジベレリンのほとんどは種子で合成されると言われている(4)。また、Dennis ら(3)は種子中に GA_4 及び GA_7 が存在することを報告している。本実験では種子のジベレリンとして GA_3 , GA_4 及び GA_7 が認められ、従来の結果と一致した。

中川(16)はモモ及びヒシホナシについて、種子を除去した幼果にジベレリンを継続的に与えることによって落果を防ぎ、それが成熟期まで発育させることができた実験結果に基づいて、種子はそこで合成されるジベレリンを介して果実の発育を制御していると述べている。また、 GA_{4+7} は単為結果及び無種子果実の発育を促進する作用があることが報告されており(1, 13), 種子のジベレリンが着果と深いかかわりを持つことが推測される。本実験において、将来落果すると予想された落果判定果の種子のジベレリン活性は正常果のそれより著しく低いという結果が得られ、サイトカイニンと同様に種子のジベレリン活性(合成能)の低下によって果実の発育が衰え、その結果離層が形成され早期落果が起こると考えられる。横田(22)はカルバリル剤によって落果が誘発された果実内のジベレリン活性が正常果のそれより低いことから本実験における結果と同様の考察をしている。

ジベレリン及びサイトカイニンは、リンゴの茎頂培養による結果(5)から新梢の生長を促進する作用を持つことが明らかとなり、また早期落果は新梢との養分競合によって生ずるという報告(17)もされていることから、これら両者は単に果実に作用し早期落果を発生させるというのではなく、新梢と果実との間の競合にも影響を及ぼし、早期落果の発生を制御しているものと考えられる。

摘 要

‘旭’2樹を用い、早期落果を促すために満開後10日目から30日間夜間温度を 25°C とする夜間加温処理を行った。すべての短果枝の中心果、計1200個の同一部位の果径を2日ごとに測定し、落果が予想される果実(落果判定果)を同定した。正常な発育を示す果実(正常果)と落果判定果を採取し、常法に従い酸性エーテル画分とn-ブタノール可溶性画分を得た。各画分の物質は生物検定法により定量した。種子中にはサイトカイニン類として、ゼアチン及びゼアチンリポシド類似物質が認められた。また、果肉組織中には先の両類似物質の他に未同定のサイトカイニン様物質が存在した。種子中のサイトカ

イニン活性は、果肉組織中の40~170倍高く、種子には高濃度でサイトカイニンが存在することから、サイトカイニンは種子で合成されていると考えた。落果判定果の種子サイトカイニン活性は正常果のその約1/15~1/40で、早期落果と種子中のサイトカイニン活性の低下は密接な関係があることが認められた。種子中のジベレリン類として GA_3 , GA_{4+7} が認められた。落果判定果の種子ジベレリン活性は正常果のそれより低かった。したがって、早期落果は種子中のサイトカイニン及びジベレリン活性の低下と密接な関係を持つものと考えられた。

謝 辞 本研究は、1983年文部省科学研究費補助金(一般研究58480039)の助成を受けて行ったものである。

引用文献

1. BUBAN, T. and I. K. INANTSY. 1977. Parthenocarpic fruit set induced by GA_{4+7} in apple cultivars. *Gartenbauwissenschaft* 42: 226—231.
2. DENNIS, D. T. and C. A. WEST. 1967. Biosynthesis of Gibberellins. III. The conversion of (-)-kaurene to (-)-kauren-19-oic acid in endosperm of *Ecinocystis macrocarpa* Greene. *J. Biol. Chem.* 242: 3293—3300.
3. DENNIS Jr., F. G. and J. P. NITSCH. 1966. Identification of gibberellins A_4 and A_7 in immature apple seed. *Nature* 211: 781—782.
4. DENNIS Jr., F. G. 1976. Gibberellin-like substances in apple seeds and fruit flesh. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101: 629—633.
5. 福井博一・今河茂・田村勉. 1981. リンゴ茎頂の生長に及ぼす生長調節物質及び糖の影響. 園学雑. 49: 549—556.
6. FUKUI, H., S. IMAKAWA and T. TAMURA. 1984. Relation between early fruit drop and embryo development in apple. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 61: 399—407.
7. 福井博一・今河茂・田村勉. 1984. リンゴ果実の早期落果に関連する種子内インドール化合物の組織内分布と組織化学的定量. 園学雑. 53: 135—140.
8. HAYASHI, F., R. NAITO, M. J. BUKOVAC and H. M. SELL. 1968. Occurrence of gibberellin A_3 in parthenocarpic apple fruit. *Plant Physiol.* 43: 448—450.
9. LEOPOLD, A. C. 1971. Physiological processes involved in abscission. *HortScience* 6: 376—378.
10. LETHAM, D. S. 1969. Regulators of cell division in plant tissues. V. The effects of zeatin and other stimulants of cell division on apple fruit development. *N. Z. J. Agric. Res.* 12: 1—20.
11. LETHAM, D. S. and M. W. WILLIAMS. 1969.

- Regulators of cell division in plant tissues. VIII. The cytokinins of the apple fruit. *Physiol. Plant.* 22 : 925—936.
12. MILLER, C. O. 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. p.194—202. In : H. F. LINSKENS and M. V. TRAYCEY (eds.) *Modern methods of plant analysis*, 6. Springer-Verlag, Berlin.
 13. MODLIBOWSKA, I. 1975. Research note Induction of parthenocarpic apples of Bramley's Seedling by low concentrations of gibberellins. *J. hort. Sci.* 50 : 21—22.
 14. 村上浩. 1968. ジベレリンの新しいイネ苗テスト“点滴法”およびそのイネ, アサガオ抽出物への適用. *Bot. Mag. Tokyo* 81 : 33—43.
 15. MURNEEK, A. E. 1954. The embryo and endosperm in relation to fruit development, with special reference to the apple, *Malus sylvestris*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 64 : 573—582.
 16. NAKAGAWA, S., I. KİYOKAWA, H. MATSUI and H. KUROOKA. 1973. Fruit development of peach and japanese pear as affected by destruction of the embryo and application of gibberellins. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 42 : 104—112.
 17. 大川勝徳. 1974. 果樹における結実と植物ホルモン. *植物の化学調節* 9 : 87—94.
 18. STADEN, J. V. 1976. The identification of zeatin glucoside from coconut milk. *Physiol. Plant.* 36 : 123—126.
 19. 田村勉・福井博一・今河茂・三野義雄. 1981. リンゴ果実及び種子の発育に及ぼす果実発育初期の温度の影響. *園学雑.* 50 : 287—296.
 20. WERTHEIM, S. J. 1973. Control of fruit abscission. Chemical control of flower and fruit abscission in apple and pear. *Acta Horticulturae* 34 : 321—331.
 21. WILLIAMS, M. W. and D. S. LETHAM. 1969. Effect of gibberellins and cytokinins on development of parthenocarpic apples. *HortScience* 4 : 215—216.
 22. 横田清. 1976. リンゴ幼果の生理落果発生に及ぼす防除薬剤の影響. *長野園試報告.* 13 : 1—24.