厳寒期におけるリンゴ属植物の耐凍性と過酸化物代謝

黒田治之¹・匂坂勝之助²・千葉和彦¹

¹農林水産省北海道農業試験場 062 札幌市豊平区羊ヶ丘1番地

²北海道大学低温科学研究所 060 札幌市北区北19条西8丁目

Cold Hardiness and Peroxide Metabolism in the Genus *Malus* in Midwinter

Haruyuki Kuroda¹, Shonosuke Sagisaka² and Kazuhiko Chiba¹

¹ The Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Sapporo 062

² The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo 060

Summary

To clarify the biochemical mechanism of differences in cold hardiness among woody species, the degree of cold hardiness and the activities of enzymes related to peroxide-producing systems and peroxide-scavenging systems were compared among 9 species containing 3 cultivars of the genus *Malus* in midwinter.

1. The twigs of the genus *Malus* could be divided into four classes with respect to cold hardiness as follows:

Tender; *M. pumila* Mill. var. *domestica* Schneid. cv. Jonathan, *M. halliana* Koehne
Moderately tender; *M. pumila* Mill. var. *domestica* Schneid. cv. Delicious, *M. asiatica* Nakai
Moderately hardy; *M. pumila* Mill. var. *domestica* Schneid. cv. McIntosh,
M. prunifolia Borkh. var. *ringo* Asami, *M. sieboldii* Rehd.,
M. sieboldii Rehd. var. *arborescens*, *M. platycarpa* Rehd.

Hardy; *M. baccata* Borkh., *M. astracanica* Dum.

2. In the living bark and xylem of twig of the genus *Malus* in midwinter, the activities of enzymes related to the peroxide-scavenging systems were higher in *M. pumila* var. *domestica* (3 cultivars), *M. astracanica*, *M. asiatica* and *M. baccata* than in other species tested. A similar result was also observed in the activities of NADH-Cyt c reductase (NADH-CcR) and Cyt c oxidase (CcO), enzymes that are related to the peroxide-producing systems. With some exceptions, the activities of enzymes in the peroxide-scavenging systems showed a significant degree of correlation with the activities of NADH-CcR or CcO. High correlation coefficients were obtained between the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and the activities of NADH-CcR (living bark, $r = +0.944^{**}$; xylem, $r = +0.877^{**}$) and CcO (living bark, $r = +0.973^{**}$; xylem, $r = +0.937^{**}$).

3. The ratio of the activity of NADH-CcR to that of G6PDH or of CcO activity to that of G6PDH was defined as the index of cellular status that represented susceptibility to oxidation stress (oxidizability index, OI) and the relationship between the values of OI and the cold hardiness of twigs was investigated. No relationship was found between the cold hardiness of twigs and the values of OI in the living bark. However, the cold hardiness of twigs showed a significant negative correlation with the ratio of the activity of NADH-CcR to that of G6PDH ($r = -0.793^{**}$) and with that of the activity of CcO to the activity of G6PDH ($r = -0.662^{*}$) in the xylem. Thus, the cold hardiness of twigs in the species and cultivars examined decreases with an increase in the values of OI in the xylem.

From these results, it appears that the cold hardiness of twigs of the genus *Malus* in midwinter is closely related to the peroxide metabolism in the xylem.

緒 言

リンゴ属植物は、ヨーロッパ、アジア、北アメリカの三大陸にわたって広く分布し、形態的変異とともに、その分布域を決定する主要な要因である耐凍性に大きな差が認められる(32)。このような植物の種類による耐凍性の差異は植物一般に認められるもので(24, 25)、多数の遺伝子で支配されるポリジーン形質によることが明らかにされている(10, 31)。しかし、耐凍性の植物差の生化学的機構については、ほとんど知られていない。

著者ら(7, 8)は、リンゴ樹における耐凍性と過酸化分解機能の関係を調べ、耐凍性がグルタチオンとアスコルビン酸を必要とする五炭糖リン酸回路に共役した過酸化分解機能と密接に関係していることを明らかにした。また、主な過酸化生成系である電子伝達系の活性は組織や器官で異なっていたが、花芽や皮層部等では低温順化期には五炭糖リン酸回路に共役した過酸化分解機能と同調して増加し、春の耐凍性減少期には相反関係になることを報告した(9)。このような結果は、耐凍性増大期には過酸化物の分解能は生成能と平衡しているか、あるいは生成能よりはるかに高い状態にあるが、耐凍性減少期には不均衡状態になることを示すもので、耐凍性変動および植物の耐凍性差が過酸化代謝と密接に関連していることを示唆している。

そこで、本研究では本本類植物の耐凍性差の生化学的機構を明らかにするために、厳寒期におけるリンゴ属9種(3品種を含む)を用いて、枝の耐凍性および過酸化物の生成系と分解系の酵素活性を調査し、これらの関連を検討した。過酸化生成系の活性指標の酵素としては、電子伝達系のNADH-シトクロムc還元酵素(NADH-CcR)とシトクロムc酸化酵素(CcO)、また、過酸化分解系の酵素としてはグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)、グルタチオン還元酵素(GSR)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSPOD)、デヒドロアスコルビン酸還元酵素(DHARD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(AsAPOD)を選び、それらの活性を測定した。また、ペルオキシダーゼ(POD)とカタラーゼ(CAT)の活性も測定した。さらに、グルコース-6-リン酸代謝の流れを知るためにヘキソキナーゼ(HK)の活性を測定した。

材料および方法

1. 材 料

北海道農業試験場果樹園に植栽されているリンゴ属植物の中から次のような9種(3品種を含む)を選んで実

験に供した。

真正リンゴ区(Eumalus Zabel)

リンゴ	<i>Malus pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i> Schneid. ('旭', 'デリシャス', '紅玉'の3品種を含む)
サンカリング	<i>M. astracanica</i> Dum.
ワリング	<i>M. asiatica</i> Nakai
マルバカイドウ	<i>M. prunifolia</i> Borkh. var. <i>ringo</i> Asami
エゾノコリリング	<i>M. baccata</i> Borkh.
ナンキンカイドウ	<i>M. halliana</i> Koehne
ズミ区(Sorbomalus Zabel)	
ミツバカイドウ	<i>M. sieboldii</i> Rehd.
コバノズミ	<i>M. sieboldii</i> Rehd. var. <i>arborescens</i>

クロロメレス区(Chloromeles Rehder)

プラティカーパ	<i>M. platycarpa</i> Rehd.
---------	----------------------------

厳寒期(1987年1月28日)に結果枝の先端の1年生枝を採取し、耐凍性の検定に供した。また、同時に採取した1年生枝をポリエチレン袋に入れて-10℃の低温室に貯蔵し、酵素活性の測定に用いた。なお、枝の酵素活性の測定は採取後20日以内に行った。

2. 耐凍性の検定

採取した1年生枝を少量の水で濡らしてからポリエチレン袋に入れ、-5℃の恒温器内に2時間置いて植水した。その後、1時間ごとに5℃ずつ低い恒温器に順次移し、それぞれ-25℃、-30℃、-35℃および-40℃の各温度に18時間置いてから5℃の恒温器に移し融解した。凍結融解した枝は2週間温室で水挿した後、芽の展開状態と各組織の褐変状態を調べ被害程度を判定した(7)。なお、一つの凍結温度につき4本の枝を使用した。

3. 粗酵素の調製

G6PDH, HK, GSR, GSPOD, DHARD, AsAPOD, PODおよびCAT活性を測定するための粗酵素液の調製は次のとおりである。皮層部あるいは木部を生重で0.2~0.3gを採取し、これに海砂0.5g, polyclar AT 0.3g, 2mM dithiothreitolを含む0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.8) 3.0ml, 2%牛血清アルブミン 1.0mlを加え、0℃条件下で乳鉢を用いて磨砕した。これを16,000×gで5分間冷却遠心し、上澄液を粗酵素液とした。

また、NADH-CcRとCcO活性を測定する粗酵素液の調製は、次のとおりである。皮層部あるいは木部を生重で0.2~0.3gを採取し、これに海砂0.5g, polyclar

AT 0.3 g, 0.25 M ショ糖と 2 mM dithiothreitol を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 3.5 ml (pH 7.8), 2% 牛血清アルブミン 1.0 ml を加え, 0 °C の条件下で乳鉢を用いて磨砕した。これを 300×g で 10 分間冷却遠心し, 上澄液を粗酵素液とした。

4. 酵素活性の測定

G6PDH, HK, GSR, GSPDH, DHARD, AsAPOD, CAT, POD, NADH-CcR および CcO の活性は, 既報の方法に従って測定した (9, 13, 18, 19, 20, 22, 23)。

結果および考察

厳寒期におけるリンゴ属植物の耐凍性を第 1 表に示した。 *M. pumila* var. *domestica* (‘紅玉’) と *M. halliana* は -25 °C の凍結で害を受け, 最も低い耐凍性を示したが, *M. pumila* var. *domestica* (‘デリシャス’) と *M. asiatica* は -25 °C の凍結に耐え, より高い耐凍性を示した。次いで高い耐凍性を示したのは, *M. pumila* var. *domestica* (‘旭’), *M. prunifolia* var. *ringo*, *M. sieboldii*, *M. sieboldii* var. *arborescens* および *M. platycarpa* で, -30 °C の凍結に耐えた。 *M. astracanica* と *M. baccata* は -35 °C の凍結に耐えられ, 調査した種および品種の中で最も高い耐凍性を示した。このような結果から, リンゴ属植物の耐凍性は低いもの (-25 °C 以上), やや低いもの (-25 °C), 比較的高いもの (-30 °C), 高いもの (-35 °C) の 4 段階に分けられるものと考えられ

る。

樹種の耐凍性の程度は, それらの分布地の冬の寒さの程度に密接に関連していることが知られている (24, 25)。リンゴ属植物においても, 種および品種の耐凍性は分化あるいは育成地域の冬の気象条件が厳しいほど高い傾向にあることが認められる。たとえば, 最も高い耐凍性を示した *M. baccata* は, 中国の河北省, 山西省北部より新疆地域に至り, さらにソ連の西シベリア東部にかけて, また *M. astracanica* はソ連のロシア南部, アストラカン地方より西シベリアの西南部にかけて, いずれも寒気の厳しい地帯に分布している (6)。次いで高い耐凍性を示した *M. prunifolia* var. *ringo* は, 中国の河北省から吉林省および西シベリア地方に分布し, *M. sieboldii* と *M. sieboldii* var. *arborescens* は北日本から朝鮮半島にかけての比較的寒冷な地に生育している。また, 北アメリカを原生地とする *M. platycarpa* は, ノースカロライナ州からジョージア州に分布しているが, この地域の冬の冷え込みはかなり厳しい (Asheville の極低温は -21.1 °C) (12)。耐凍性が最も低い *M. halliana* は, 中国の中部 (楊子江沿岸) の温暖な地が原産である (6)。ソ連のアルメニア地方を起源とする *M. pumila* は, 北アメリカ大陸で著しい分化を遂げたが, 耐凍性の高い *M. pumila* var. *domestica* (‘旭’) は寒気の厳しいカナダ・オンタリオ州 (Ottawa の極低温

Table 1. Cold hardiness of twigs of species and cultivars of genus *Malus* in midwinter^z.

Species or cultivar	Freezing temperature ^y (°C)			
	-25	-30	-35	-40
Eumalus Zabel				
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i> Schneid. cv. McIntosh	○	○	△	●
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i> Schneid. cv. Delicious	○	△	△	●
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i> Schneid. cv. Jonathan	△	△	●	●
<i>M. astracanica</i> Dum.	○	○	○	△
<i>M. asiatica</i> Nakai	○	△	●	●
<i>M. prunifolia</i> Borkh. var. <i>ringo</i> Asami	○	○	△	△
<i>M. baccata</i> Borkh.	○	○	○	△
<i>M. halliana</i> Koehne	△	△	●	●
Sorbomalus Zabel				
<i>M. sieboldii</i> Rehd.	○	○	△	●
<i>M. sieboldii</i> Rehd. var. <i>arborescens</i>	○	○	△	△
Chloromeles Rehder				
<i>M. platycarpa</i> Rehd.	○	○	△	△

^z Sampled and examined on 28 January 1987.

^y Twigs were cooled in 5 °C steps at hourly intervals to successively lower temperatures to -40 °C. They were held for 18 hr at the selected test temperatures, then thawed in air at 5 °C. Thereafter the twigs were placed in water in a green house for 2 weeks. Injury due to freezing was then evaluated visually from browning of the tissues and budding. ○, normal; △, injured; ●, killed.

Table 2. Activities of enzymes associated with peroxide-scavenging systems in living bark and xylem of twigs of genus *Malus* in midwinter^z.

Species or cultivar	Tissue ^y	G6PDH	HK	GSR	GSPOD	DHARD	AsAPOD	POD	CAT
		(μmol·g ⁻¹ dry wt·hr ⁻¹)							
Eumalus Zabel									
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i>	LB	279.0	21.1	9.5	30.3	70.8	561.6	946	33670
Schneid. cv. McIntosh	X	106.8	11.1	16.6	11.3	18.9	213.2	898	11421
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i>	LB	210.4	24.0	8.4	23.6	39.0	821.1	1233	42759
Schneid. cv. Delicious	X	94.9	9.0	8.3	12.2	19.8	217.0	506	14141
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i>	LB	189.8	26.3	30.3	34.3	26.9	900.6	1264	38546
Schneid. cv. Jonathan	X	83.6	11.5	18.5	18.5	10.8	291.6	780	22146
<i>M. astracanica</i> Dum.	LB	259.6	26.0	7.3	18.1	36.2	191.0	1641	44178
	X	83.1	7.0	16.5	12.4	9.1	65.3	69	11765
<i>M. asiatica</i> Nakai	LB	170.9	23.5	6.5	30.0	54.8	943.0	882	19520
	X	54.1	6.7	4.1	11.4	14.5	340.4	335	5383
<i>M. prunifolia</i> Borkh. var. <i>ringo</i> Asami	LB	43.5	6.3	17.4	5.7	26.5	161.9	516	8113
	X	24.1	4.5	6.8	6.8	13.0	102.5	196	4469
<i>M. baccata</i> Borkh.	LB	280.2	26.0	319.4	29.3	79.4	240.5	2915	26404
	X	50.5	8.8	6.6	18.0	12.0	46.5	316	2876
<i>M. halliana</i> Koehne	LB	54.5	12.7	23.0	18.4	21.3	219.4	418	11939
	X	17.6	3.6	5.4	7.3	7.3	42.4	396	2426
Sorbomalus Zabel									
<i>M. sieboldii</i> Rehd.	LB	13.0	4.5	4.5	10.5	1.0	107.9	982	3746
	X	12.0	3.9	1.5	12.4	3.2	57.4	132	3354
<i>M. sieboldii</i> Rehd. var. <i>arborescens</i>	LB	16.6	5.8	46.3	10.1	2.3	122.9	612	4352
	X	7.5	3.4	8.8	3.8	1.8	32.6	83	1909
Chloromeles Rehder									
<i>M. platycarpa</i> Rehd.	LB	17.3	11.5	17.3	27.1	38.6	96.2	567	5111
	X	9.5	1.4	2.7	11.9	21.4	22.7	131	1031

Values represent means of results of 2 separate experiments. Abbreviations: G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; HK, hexokinase; GSR: glutathione reductase; GSPOD, glutathione peroxidase; DHARD, dehydroascorbate reductase; AsAPOD, ascorbate peroxidase; POD, peroxidase; CAT, catalase.

^z Sampled on 28 January 1987, and assayed between 30 January and 15 February 1987.

^y LB, living bark; X, xylem.

Table 3. Correlation of activities of enzymes associated with peroxide-scavenging systems in living bark and xylem of twigs of genus *Malus* in midwinter.

	G6PDH	HK	GSR	GSPOD	DHARD	AsAPOD	POD	CAT
G6PDH		0.916**	0.115	0.615*	0.767**	0.760**	0.654*	0.972**
HK	0.893**		0.135	0.833**	0.814**	0.731**	0.605*	0.922**
GSR	0.681*	0.679*		0.131	0.201	-0.138	0.315	0.028
GSPOD	0.606*	0.468	0.062		0.617*	0.616*	0.453	0.620*
DHARD	0.593	0.250	0.201	0.553		0.530	0.298	0.716*
AsAPOD	0.770**	0.767**	0.441	0.364	0.425		0.312	0.768**
POD	0.605*	0.622*	0.347	0.418	0.531	0.687*		0.617*
CAT	0.876**	0.863**	0.696*	0.445	0.310	0.823**	0.519	

For complete list of abbreviations, see Table 2. Right upper side, living bark; lower left side, xylem.

**, * Significant at the 1% and the 5% level, respectively.

Table 4. Activities of NADH-Cyt c reductase and Cyt c oxidase in living bark and xylem of twigs of genus *Malus* in midwinter^z.

Species or cultivar	Tissue ^y	NADH-Cyt c reductase	Cyt c oxidase
		(μmol Cyt c·g ⁻¹ dry wt·hr ⁻¹)	
Eumalus Zabel			
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i>	LB	80.9	242.3
Schneid. cv. McIntosh	X	39.0	42.4
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i>	LB	85.8	240.0
Schneid. cv. Delicious	X	78.9	82.1
<i>M. pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i>	LB	57.0	158.8
Schneid. cv. Jonathan	X	66.2	81.6
<i>M. astracanica</i> Dum.	LB	97.6	282.4
	X	19.7	23.1
<i>M. asiatica</i> Nakai	LB	31.6	80.5
	X	16.3	14.7
<i>M. prunifolia</i> Borkh. var. <i>ringo</i> Asami	LB	20.3	16.1
	X	11.9	9.0
<i>M. baccata</i> Borkh.	LB	127.5	401.3
	X	16.4	16.8
<i>M. halliana</i> Koehne	LB	16.1	20.8
	X	21.7	6.1
Sorbomalus Zabel			
<i>M. sieboldii</i> Rehd.	LB	12.0	5.4
	X	5.3	5.2
<i>M. sieboldii</i> Rehd. var. <i>arborescens</i>	LB	12.5	13.5
	X	4.5	3.6
Chloromeles Rehder			
<i>M. platycarpa</i> Rehd.	LB	10.5	6.0
	X	4.6	2.9

Values represent means of results of 2 separate experiments.

^z Sampled on 28 January 1987, and assayed between 5 February and 18 February 1987.

^y LB, living bark; X, xylem.

は-37.2℃) (12)が原産である。このようなことから、リンゴ属植物が示す耐凍性の差異は、それぞれの種および品種の分化あるいは育成地域の寒冷気候に対する適応の側面を表しているものと考えられる。

厳寒期におけるリンゴ属植物の過酸化物質分解系の酵素活性は第2表に示すように、種と品種間で大きな差異がみられた。五炭糖リン酸回路の初発酵素であるG6PDH活性は、皮層部と木部のいずれにおいても *M. pumila* var. *domestica* の3品種と *M. astracanica*, *M. asiatica*, *M. baccata* で高いのに対して、*M. prunifolia* var. *ringo*, *M. halliana*, *M. sieboldii*, *M. sieboldii* var. *arborescens*, *M. platycarpa* で低く、特に *M. sieboldii* の皮層部におけるG6PDH活性は、*M. baccata* におけるその約1/22の極めて低いレベルを示した。なお、G6PDH活性と耐凍性との間には一定の関係はみられなかった。

G6PDH活性と他の酵素活性の相関関係をみると、皮層部ではGSR、木部ではDHARDを除いていずれもG6PDH活性と正の有意な相関関係がみられ、五炭糖リン酸回路とアスコルビン酸とグルタチオンを必要とする過酸化物質分解系との共役関係が示された(7, 8)。また、PODとCAT活性もG6PDH活性と正の有意な相関がみられ、G6PDH活性と密接に関係していることが認められた(第3表)。

一方、過酸化物質生成系である電子伝達系のNADH-CcRとCcO活性も過酸化物質分解系酵素の活性と同様の結果が得られ、皮層部、木部のいずれにおいても、*M. pumila* var. *domestica* の3品種、*M. astracanica*, *M. asiatica*, *M. baccata* で高く、*M. prunifolia* var. *ringo*, *M. halliana*, *M. sieboldii*, *M. sieboldii* var. *arborescens*, *M. platycarpa* で低かった(第4表)。なお、NADH-CcR活性とCcO活性の間には、皮層部では

$r=+0.980^{**}$, 木部では $r=+0.967^{**}$ の相関係数が得られ, 両酵素の共役関係が示された。

細胞内では, 過酸化物の生成と分解の間には平衡関係が成立していることが生存上必要と考えられる。そこで, 本実験で得られた結果から過酸化物の生成能と分解能との間の相関関係を調べた。その結果, 五炭糖リン酸回路に共役した過酸化物分解系の G6PDH 活性と過酸化物生成系の NADH-CcR 活性の間には第 1 図

に示すように, 皮層部では $r=+0.944^{**}$, 木部では $r=+0.877^{**}$ の正の高い相関係数が得られた。また, G6PDH 活性と CcO 活性の間にも, 皮層部では $r=+0.973^{**}$, 木部では $r=+0.937^{**}$ の正の高い相関係数が得られた(第 2 図)。他の過酸化物分解系の酵素活性と過酸化物生成系の NADH-CcR あるいは CcO 活性の関係は第 5 表に示すように, GSPOD, 皮層部の GSR および木部の DHARD を除いて, 正の有意な相関関係が認められた。このような結果から, 過酸化物の生成と分解の間には平衡関係が成立しているものと考えら

Fig. 1. Relationship between the activity of NADH-Cyt c reductase and that of glucose-6-phosphate dehydrogenase in living bark and xylem of twigs of genus *Malus* in midwinter. 1. *M. pumila* Mill. var. *domestica* Schneid. cv. McIntosh, 2. *M. pumila* Mill. var. *domestica* Schneid. cv. Delicious, 3. *M. pumila* Mill. var. *domestica* Schneid. cv. Jonathan, 4. *M. astracanica* Dum., 5. *M. asiatica* Nakai, 6. *M. prunifolia* Borkh. var. *ringo* Asami, 7. *M. baccata* Borkh., 8. *M. halliana* Koehne, 9. *M. sieboldii* Rehd., 10. *M. sieboldii* Rehd. var. *arborescens*, 11. *M. platycarpa* Rehd. ○, living bark; ●, xylem.

** Significant at the 1% level.

Fig. 2. Relationship between the activity of Cyt c oxidase and that of glucose-6-phosphate dehydrogenase in living bark and xylem of twigs of genus *Malus* in midwinter. Number and symbols are explained in the legend to Fig. 1.

** Significant at the 1% level.

Table 5. Correlation coefficients between activities of enzymes associated with peroxide-scavenging systems and activities of NADH-Cyt c reductase or Cyt c oxidase in living bark and xylem of twigs of genus *Malus* in midwinter.

	Tissue ^z	HK	GSR	GSPOD	DHARD	AsAPOD	POD	CAT
NADH-Cyt c reductase	LB	0.861**	0.231	0.559	0.654*	0.639*	0.767**	0.953**
	X	0.813**	0.663*	0.468	0.527	0.791**	0.779**	0.863**
Cyt c oxidase	LB	0.885**	0.209	0.588	0.672*	0.695*	0.408	0.954**
	X	0.895**	0.690*	0.550	0.484	0.747**	0.709**	0.944**

For complete list of abbreviations, see Table 2. **, * Significant at the 1% and 5% level, respectively.

^z LB, living bark; X, xylem.

れる。分化あるいは育成の過程で酸素の利用効率を高めた種および品種は、酸素毒を防ぐ機能を同時に高めたものといえよう(4)。

一方、過酸化物質の生成系と分解系との間の平衡関係は、オゾン(26)、 SO_2 (28, 30)、重金属(27)、低温(33)、日射(14)などの環境ストレスによって攪乱され、この場合、植物は活性酸素を多量に発生することが知られている。活性酸素は細胞内のタンパク質(3, 30)、脂質(5, 28)、DNA(1, 11)など多くの分子と反応して細胞死を含む重大な障害を引き起こす。Sagisaka(20, 21)は、長期間凍結状態においた植物組織ではグルタチオンとアスコルビン酸を必要とする過酸化物質消去系の消耗が進んで脂肪酸の過酸化物質の生成が増加する状態となって、死に至ることを明らかにしている。また、著者ら(9)は春のリンゴ樹では過酸化物質の生成系活性が分解系活性に比べて高いため細胞内が酸化されやすい状態と

なって、これが耐凍性低下を引き起こす要因になっていることを示す結果を得ている。このようなことから、植物の耐凍性は細胞内の酸化ストレスと関係していることが推察される。

細胞内成分の酸化が進みやすい状態は、過酸化物質の生成系の活性に比べて分解系の活性が低い時に起こる。そこで、過酸化物質生成系(電子伝達系)の活性指標の酵素として NADH-CcR あるいは CcO、また、過酸化物質分解系の活性指標の酵素としては G6PDH を選び、両者の活性比を酸化ストレスに対する感受性を表す細胞内状態の指標(oxidizability index, OI)と定義し、リンゴ属植物における皮層部と木部の OI 値と枝の耐凍性との関係を検討した。なお、4段階に分けられたリンゴ属植物の耐凍性は 1(低いもの)、2(やや低いもの)、3(やや高いもの)、4(高いもの)として表した。第3図は NADH-CcR 活性/G6PDH 活性比と枝の耐凍性の相関関係を示したものである。皮層部の OI 値と枝の耐凍

Fig. 3. Relationship between cold hardness and oxidizability index (activity of NADH-Cyt c reductase / activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase) in living bark and xylem of twigs of genus *Malus* in midwinter. A, living bark; B, xylem. Level of cold hardness is represented by numerals: 1, tender; 2, moderately tender; 3, moderately hardy; 4, hardy. Numbers are explained in the legend to Fig. 1.

** Significant at the 1% level.

Fig. 4. Relationship between cold hardness and oxidizability index (activity of Cyt c oxidase / activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase) in living bark and xylem of twigs of genus *Malus* in midwinter. A, living bark; B, xylem. Level of cold hardness and numbers are explained in the legend to Fig. 3 and Fig. 1, respectively.

* Significant at the 5% level.

性との間には一定の関係が認められなかったが、木部のOI値と枝の耐凍性の間には負の高い相関係数($r = -0.793^{***}$)が得られ、耐凍性が高い *M. baccata* と *M. astracanica* ではOI値が低く、*M. halliana* と *M. pumila* var. *domestica* (‘紅玉’) のように耐凍性の低い種ではOI値が高い傾向が認められた。また、CcO 活性/G6PDH 活性比と枝の耐凍性の間でも、皮層部では一定の関係が認められなかったが、木部ではOI値と枝の耐凍性の間には負の相関係数($r = -0.662^*$)が得られた(第4図)。なお、CAT 活性を G6PDH 活性に代えて計算した値と枝の耐凍性の間には相関関係は認められなかった。このような結果から、リンゴ属植物の枝の耐凍性は木部組織のOI値と密接に関係し、木部組織のOI値が高い種あるいは品種ほど低くなるものと考えられる。

OI値が高いことは、過酸化物の生成系に比べ五炭糖リン酸回路に共役した過酸化物分解系の機能が低く、酸化ストレスを受けやすいことを意味する。したがって、リンゴ属植物の耐凍性差は酸化ストレスに対する感受性の差異によって次のように説明できるものと思われる。すなわち、*M. halliana* や *M. pumila* var. *domestica* (‘紅玉’) のようにOI値が高い種あるいは品種は、過酸化物を除去する能力が相対的に低いために、酸化ストレスによる凍害を受けやすく、結果的に低い耐凍性を示すと考えられる。一方、*M. baccata* や *M. astracanica* のようにOI値が低い種は、過酸化物を除去する能力が高いため酸化的ストレスを受け難く、結果として高い耐凍性を示すものと推察される。このような考えは、植物の寒冷適応が酸化ストレスに対する生体防御と密接に関連していることを示唆するものである。

厳寒期におけるリンゴ属植物の枝の耐凍性は木部の過酸化物代謝と密接に関係し、木部組織の耐凍性が越冬上の制限要因になっていることが示された。このことは、厳寒期における果樹の木部組織は他の器官・組織に比べて耐凍性が低いために(2)、“Blackhearted wood” と呼ばれる凍害を選択的に受けやすく(29)、木部組織の耐凍性の高低が越冬上重要な要因になっているという事実からも支持される。皮層部と木部では組織の役割が異なるので越冬上どちらが重要であるかという論議はあまり意味があるものとはいえないが、冬季における木部組織は皮層部と同等あるいはそれ以上の活性水準を保持しており(15, 16, 17, 18, 19, 22)、植物個体の耐凍性に重要な役割を担っているものと考えられる。

摘 要

木本類植物の耐凍性差の生化学的機構を明らかにするために、厳寒期におけるリンゴ属植物(*Malus*) 9種(3品種を含む)を用いて、耐凍性と過酸化物代謝の関連について検討した。

1. リンゴ属植物の枝の耐凍性は次のように高低4階級に分けられた。

低いもの：*M. pumila* var. *domestica* (‘紅玉’),
M. halliana

やや低いもの：*M. pumila* var. *domestica* (‘デリシャス’), *M. asiatica*

やや高いもの：*M. pumila* var. *domestica* (‘旭’),
M. prunifolia var. *ringo*, *M. sieboldii*,
M. sieboldii var. *arborescens*,
M. platycarpa

高いもの：*M. baccata*, *M. astracanica*

2. 過酸化物分解系の酵素活性は皮層部と木部のいずれにおいても *M. pumila* var. *domestica* の3品種と *M. astracanica*, *M. asiatica*, *M. baccata* で高く、*M. prunifolia* var. *ringo*, *M. halliana*, *M. sieboldii*, *M. sieboldii* var. *arborescens*, *M. platycarpa* で低かった。主要な過酸化物生成系である電子伝達系のNADH-CcRとCcO活性も同様の結果を得た。皮層部と木部のいずれにおいても、一部の例外を除いて過酸化物分解系の酵素活性と過酸化物生成系の酵素活性との間には有意の相関関係がみられ、特にG6PDH活性とNADH-CcR(皮層部, $r = +0.944^{**}$; 木部, $r = +0.877^{**}$)あるいはCcO活性(皮層部, $r = +0.973^{**}$; 木部, $r = +0.937^{**}$)との間に高い相関係数が得られた。

3. NADH-CcR活性/G6PDH活性比あるいはCcO活性/G6PDH活性比を酸化ストレスに対する感受性を表す細胞内状態の指標(oxidizability index, OI)と定義し、OI値と枝の耐凍性の関係を検討した。枝の耐凍性と皮層部のOI値の間には一定の関係がみられなかった。しかし、枝の耐凍性と木部のNADH-CcR活性/G6PDH活性比($r = -0.793^{**}$)あるいはCcO活性/G6PDH活性比($r = -0.662^*$)の間には負の高い相関係数が得られ、枝の耐凍性は木部組織のOI値が高い種あるいは品種ほど低いことが示された。

以上の結果から、厳寒期におけるリンゴ属植物の枝の耐凍性は木部の過酸化物代謝と密接に関係しているものと考えられる。

引用文献

1. Brawn, K. and I. Fridovich. 1981. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. Arch. Biochem. Biophys. 206 : 414-419.
2. Chandler, W.H. 1913. The killing of plant tissue by low temperature. Mo. Agr. Expt. Sta. Res. Bul. 8 : 141-309.
3. Charles, S.A. and B. Halliwell. 1980. Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. Biochem. J. 189 : 373-376.
4. Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science 201 : 875-880.
5. Fridovich, S.E. and N.A. Porter. 1981. Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 256 : 260-265.
6. 菊池秋雄. 1948. 果樹園芸学. 上巻. 果樹種類各論. p.10-63. 養賢堂. 東京.
7. Kuroda, H., S. Sagisaka and K. Chiba. 1990. Seasonal changes in peroxide-scavenging systems of apple trees in relation to cold hardiness. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59 : 399-408.
8. Kuroda, H., S. Sagisaka and K. Chiba. 1990. Frost induces cold acclimation and peroxide-scavenging systems coupled with the pentose phosphate cycle in apple twigs under natural conditions. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59 : 409-416.
9. Kuroda, H., S. Sagisaka, M. Asada and K. Chiba. 1991. Seasonal variation in the activities of NADH-cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase in plastids, mitochondria and microsomes in apple trees. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60 : 466.
10. Lantz, H.L. and B.S. Picket. 1942. Apple breeding: Variation within and between progenies of Delicious with respect to freezing injury due to the November freeze of 1940. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 40 : 237-240.
11. Lesko, S.A., R.J. Lorentzen and P.O.P. Ts'o. 1980. Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. Biochemistry 19 : 3023-3028.
12. 中川行夫. 1968. 果樹の気象的適地条件に関する研究. (5). 世界のブドウ, リンゴ産地の気象解析. 園試報. A7 : 111-144.
13. Nakagawara, S. and S. Sagisaka. 1984. Increase in enzyme activities related to ascorbate metabolism during cold acclimation in poplar twigs. Plant Cell Physiol. 25 : 899-906.
14. Rabinowitch, H.D. and D. Sklan. 1980. Superoxide dismutase: A possible protective agent against sunscald in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Planta 148 : 162-167.
15. Sagisaka, S. 1972. Decrease of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in the xylem of *Populus gelrica* on budding. Plant Physiol. 50 : 750-755.
16. Sagisaka, S. 1980. Occurrence of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-linked glyoxylate reductase in nonphotosynthetic xylem tissue of perennials. Plant Physiol. 65 : 377-381.
17. Sagisaka, S. 1981. Adenosine triphosphate levels in the poplar during one year of growth. Plant Cell Physiol. 22 : 1287-1292.
18. Sagisaka, S. and M. Asada. 1981. Coordinate and noncoordinate changes in enzyme activities in pentose phosphate cycle in poplar: A control of enzyme activities in differentiated xylem. Plant Cell Physiol. 22 : 1459-1468.
19. Sagisaka, S. 1982. Comparative studies on the metabolic function of differentiated xylem and living bark of wintering perennials. Plant Cell Physiol. 23 : 1337-1346.
20. Sagisaka, S. 1985. Injuries of cold acclimatized poplar twigs resulting from enzyme inactivation and substrate depression during frozen storage at ambient temperatures for a long period. Plant Cell Physiol. 26 : 1135-1145.
21. Sagisaka, S. 1986. Limited survival period of cold acclimatized trees in frozen ambient temperatures. Plant Cell Physiol. 27 : 1209-1212.
22. Sagisaka, S. and M. Asada. 1986. Cytochemical evidence for the occurrence in plants of a novel microbody that contains peroxidase. Plant Cell Physiol. 27 : 1599-1602.
23. Sagisaka, S., M. Asada and H. Kuroda. 1989. Dormancy breaking is followed by mitochondria proliferation in poplar and apple trees in milieu of midwinter. Plant Cell Physiol. 30 : 79-84.
24. Sakai, A. and C.J. Weiser. 1973. Freezing resistance of trees in north America with reference to tree regions. Ecology 54 : 118-126.
25. Sakai, A. 1978. Freezing tolerance of evergreen and deciduous broad-leaved trees in Japan with reference to tree regions. Low Temp. Sci. B 36 : 1-19.
26. Sakaki, T., N. Kondo and K. Sugahara. 1983. Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: Role of active oxygens. Physiol. Plant. 59 : 28-34.
27. Sandmann, G. and P. Böger. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. Plant Physiol. 66 : 797-800.
28. Shimazaki, K., T. Sakaki, N. Kondo and K. Sugahara. 1980. Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂-fumigated leaves of spinach. Plant Cell Physiol. 21 : 1193-1204.
29. Steinmetz, F.H. and M.T. Hilborn. 1937. A histological evaluation of low temperature injury to

- apple trees. Maine Agr. Expt. Sta. Bul. 388.
30. Tanaka, K., T. Otsubo and N. Kondo. 1982. Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of calvin-cycle SH enzymes in SO₂-fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 23 : 1009-1018.
 31. Toyao, T. 1982. Inheritance of cold hardiness of tea plants in crosses between var. *Sinensis* and var. *Assamica*. p. 591-603. In: P. H. Li and A. Sakai (eds). *Plant and cold hardiness*. Vol. 2. Academic Press, New York.
 32. Westwood, M.N. 1970. Rootstock-scion relationships in hardiness of deciduous fruit trees. *Hort-Science* 5 : 418-421.
 33. Wise, R.R. and A.W. Naylor. 1987. Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* 83 : 278-282.