ブドウの芽の自発休眠誘導に対するグルタチオンの役割

東部光伸・望岡亮介・堀内昭作・尾形凡生・塩崎修志・黒岡 浩

大阪府立大学農学部 599-8531 大阪府堺市学園町 1-1

The Role of Glutathione on the Onset of Endodormancy of Grape Buds

Mitsunobu Tohbe, Ryosuke Mochioka, Shousaku Horiuchi, Tsuneo Ogata, Shuji Shiozaki and Hiroshi Kurooka

College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531

Summary

The role of glutathione, which maintains protein thiol groups in the reduced state in living cells, on the onset of endodormancy (rest) of grape buds was investigated.

When potted grapevines were exposed to 30 °C/25 °C (high), day/night, or 20 °C/15 °C (low), day/night, before the onset of bud dormancy, buds administered low temperature became dormant, but those treated with high temperature did not.

On shoots treated with low temperature, endogenous ABA levels increased soon after treatment, whereas ABA levels in shoots treated with high temperature remained low. Reduced glutathione (GSH) content in the shoots treated with high temperature increased, whereas in shoots treated with low temperature, it decreased gradually. Oxidized glutathione (GSSG) content in the shoots treated with high temperature remained almost constant during the experimental period, whereas under the low temperature treatment it increased.

GSSG content increased in shoots induced to dormancy by the ABA treatment. Furthermore, exogenous treatment with GSSG inhibited budbreak.

Therefore, we conclude that glutathione is one of the potent factors in controlling grape bud dormancy.

Key Words: bud, endodormancy, glutathione, grape.

緒 言

落葉果樹の芽には休眠が存在するが、休眠誘導の要因としては、短日、低温、土壌の乾燥ならびに樹体の水分含量の低下などがあげられる (中川, 1978). 特にブドウでは、日長よりも低温条件が休眠誘導を引き起こす要因と考えられている (Nigondo, 1967). また、樹体内のホルモン含量も大きく影響し、休眠誘導時にはジベレリンなどの生長促進ホルモンが減少し、ABA などの生長抑制ホルモンが増加することが知られている (Westwood, 1993). さらに、Fuchigami・Nee (1987) は、生体内の酸化還元反応を担っているグルタチオン (γ -グルタミルシステイニル-グリシン) が休眠をコントロールしているのではないかと報告している. グルタチオンは植物の各器官に広く分布するトリペプチドで、ある種の酵素の補酵素として働き、加えて、酵素やタンパク質のチオール基 (SH 基) を保護する抗酸化剤として作用すると考えられている (Rennenberg, 1982). また、筆者ら (東部ら, 1998) は、ブドウ 'デラウェア' の

1997年8月15日 受付. 1998年1月26日 受理.

休眠枝を還元型グルタチオンで処理すると休眠が打破されるが、酸化型グルタチオンで処理すると萌芽率の低下および萌芽の遅延が生じることを見いだしている. しかし、ブドウの芽の休眠誘導におけるグルタチオンの役割については詳しく調べられていない.

そこで本研究では、休眠誘導を促す低温処理および ABA 処理が新梢のグルタチオン含量に及ぼす影響について調査するとともに、休眠誘導とグルタチオンとの関連について検討した.

材料および方法

実験1. 温度処理が新梢の ABA およびグルタチオン含量に及ぼす影響

実験材料には、15 liter のポットに植えた2年生の 'デラウェア' を用い、自発休眠前の1991年8月13日に人工気象室内に搬入して、10月下旬まで温度処理を行った. 処理区は高温処理区: 昼温 30 °C/夜温 25 °C, 低温処理区: 同 20 °C/15 °C とし、対照区は自然条件とした. なお、夜温の処理は19時から7時までの12時間とし、日長は自然条件とした. 1区につき12個体を使

用した。処理期間中に新梢を基部より経時的に5本ずつ採取し、萌芽率の測定には、基部より4, 8, 12, 16および20節目、ABA含量の測定には、6, 10, 14, 18および22節目、還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (グルタチオン分子の二量体, GSSG) 含量の測定には、7, 11, 15, 19および23節目の芽を含む新梢の節部を供試した。

萌芽率の調査は、25℃条件下のパーミキュライト床に30本を1芽挿し、挿し木30日後における萌芽率を測定することにより行った。ABAは、Guinnら(1986)の方法で抽出し、望岡ら(1996)の方法で精製した後、HPLCで定量した。また、グルタチオンは雨木・樋口(1991)の方法をもとに、第1図に示した手順で抽出し、Tietze(1969)の方法で定量した。ただし、GSH含量は総グルタチオン含量からGSSG含量を減じた値で示した。

実験2. ABA処理が芽の休眠誘導と新梢のグルタチオン含量に及ぼす影響

実験材料には、15 literのポット植え2年生の‘デラウェア’を用いた。1992年8月28日に、新梢の基部から数えて第2節と第3節の節間部を環状はく皮し、そこに50 ppmのABA水溶液をしみ込ませた脱脂綿を当て、9月11日まで2週間はく皮部よりABA水溶液を吸収させた。ただし、ABA水溶液は3日ごとに補充し、処理部位をアルミ箔で包んで遮光した。なお、対照区はABA処理区と同節位で環状はく皮した後、脱イオン水を用いて同様の処理を行った。ABA処理区、対照区とも、10個体を使用した。

処理1日後の8月29日および処理2週間後の9月11日に、処理枝の基部から4~15節中の偶数節位の切り枝を萌芽率の測定に、奇数節位の切り枝をGSHおよびGSSG含量の測定に供試した。なお、萌芽率の測定は、ABA処理区および対照区とも1芽を付けた30本の挿し穂を用い、実験1の方法に準じて行った。

実験3. グルタチオン処理が芽の休眠誘導に及ぼす影響

1992年8月20日に15 literのポット植え2年生‘デラウェア’の新梢の基部から3~12節位の切り枝を実験に供試した。処理区は、(1)5 mM GSH, (2)5 mM GSSGおよび(3)対照区(無処理)の3区を設け、供試した切り枝の芽と切り口に(1), (2)の処理液をそれぞれ塗布処理した。萌芽率の測定は実験1と同様に30本の1芽挿し個体を用いて行い、処理区による節位の偏りがないうよう、各区に節位を均等に配分した。なお、萌芽率が対照区より低くなったものについては、休眠が誘導されたものとみなした。

結 果

実験1. 温度処理が新梢のABAおよびグルタチオン含量に及ぼす影響

温度処理における萌芽率の推移を第2図に示した。対照区では、9月上旬の萌芽率は90%以上の高い値を示した。しかし、9月中旬には萌芽率は約70%に低下し、その後も引き続き萌芽率の低下が見られた。高温処理区(昼温30℃/夜温25℃)では、全処理期間を通して80%以上の高い萌芽率を維持し、休眠誘導は認められな

Fig. 1. Flow diagram showing procedure for extraction and purification of glutathione.

かった。一方、低温処理区（同 20 °C/15 °C）では、対照区と比較して早期に萌芽率が低下し、休眠が誘導された。

新梢の ABA 含量の推移を第 3 図に示した。対照区では、休眠誘導に伴って ABA 含量が増加し、10 月下旬には約 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{fw}$ の値を示した。一方、低温処理区では対照区よりも早く ABA 含量が増加し始め、落葉直前の 9 月中旬に $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{fw}$ 達し、落葉後漸減した。また、高温処理区では全処理期間を通して、ABA 含量は $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{fw}$ 以下の低い値で推移した。

グルタチオン含量の推移を第 4 図に示した。GSH 含量は、対照区では休眠が深まるのに伴って徐々に低下す

る傾向が認められたのに対し、高温処理区では、9 月上旬以降対照区よりも高い値で推移した。低温処理区では、処理開始時以降常に対照区よりも低い値で推移し、落葉直前の 9 月中旬に最低値 ($16.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{fw}$) を示した後、漸増した（第 4 図 A）。GSSG 含量は、対照区では休眠が最も深い 10 月下旬に最大値を示した。それに対して、高温処理区では、9 月中旬を除いては対照区よりも低い値で推移した。また、低温処理区では、処理開始後から GSSG 含量が増加し、10 月下旬を除き、対照区よりも高い値で推移した（第 4 図 B）。

実験 2. ABA 処理が芽の休眠誘導と新梢のグルタチオン含量に及ぼす影響

ABA 処理後の萌芽率およびグルタチオン含量の変化を第 1 表に示した。萌芽率は処理 1 日後の 8 月 29 日には ABA 処理区、対照区とも 100%であったのに対し、処理 2 週間後の 9 月 11 日には対照区で 80%，ABA 処理区で 40%となり、ABA 処理により休眠が誘導される

Fig. 2. Seasonal changes in the percentage of budbreak on single bud cuttings of 'Delaware' grape harvested at different times of the season and exposed to high or low temperatures. ● : Control, △ : 30 °C/25 °C (high), day/night, □ : 20 °C/15 °C (low), day/night, Arrows: Autumnal leaf fall.

Fig. 3. Seasonal changes in ABA level in intact shoots of 'Delaware' grape exposed to high or low temperatures. ●, △, □, arrows: Same as Fig. 2.

Fig. 4. Seasonal changes in the level of reduced glutathione (GSH) (A) and oxidized glutathione (GSSG) (B) in intact shoots of 'Delaware' grape exposed to high or low temperatures. ●, △, □, arrows: Same as Fig. 2.

Table 1. Percentage of budbreak and glutathione content in 'Delaware' grape shoots treated with ABA.

Treatment	One day after ABA treatment			Two weeks after ABA treatment		
	% of budbreak ²	GSH content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	GSSG content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	% of budbreak	GSH content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	GSSG content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)
50 ppm ABA	100	20.4	2.5	40.0	18.8	4.7
Cont.	100	20.2	2.3	80.0	19.8	2.5
Significance		NS	NS		NS	*

² : 30 days after cuttings were planted.

* : Significant at 5 % level.

NS : Not significant.

傾向が認められた。GSH 含量は両処理区間に有意差が認められなかったが、処理 2 週間後の GSSG 含量は ABA 処理区で対照区の約 2 倍の値であった。

実験 3. グルタチオン処理が芽の休眠誘導に及ぼす影響

グルタチオン処理における萌芽率の変化を第 5 図に示した。対照区では、挿し木 11 日後に萌芽を開始し、挿し木 17 日後には萌芽率が 100% に達した。GSH 処理区では、対照区よりもやや萌芽が早まり、挿し木 15 日後に萌芽率は 100% となった。一方、GSSG 処理区では、対照区よりも萌芽開始がやや遅れ、その後も萌芽率は対照区より低い値で推移し、挿し木 19 日後に 100% の萌芽率に達した。

考 察

堀内ら (1981) は、ブドウ 'デラウェア' の休眠の深さの季節的变化を調査し、新梢の登熟が始まる 8 月より自発休眠の誘導が始まり、10~11 月上旬には最深期となり、落葉後徐々に休眠打破が始まり、冬期の低温に遭遇した後、1 月下旬には完全に覚醒することを認めている。本実験において、対照区では 9 月上旬の萌芽率が 90% 以上であったことから、自然条件下での休眠誘導は 9 月以降に開始することが明らかとなった。また、これまでの報告では、ブドウの芽の休眠誘導の条件として、短日、低温、乾燥条件などがあげられている (武井, 1991) が、なかでも気温の低下が休眠誘導に最も重要な要因と推察されている (堀内, 1977; Nigondo, 1967)。特に堀内 (1977) は、大阪と鹿児島で栽培されている 'デラウェア' の休眠誘導と両地域の気温の変化を比較調査したところ、両地域において最低気温が 18 °C を下回ると休眠誘導されること、10 °C 以下になると落葉が始まることから、18~10 °C が最も休眠誘導と関連の深い温度であると推察した。日長を自然条件とし、処理温度を変えた実験 1 において、高温処理区 (昼温 30 °C/夜温 25 °C) では実験期間中、休眠誘導が起らなかったのに対し、

Fig. 5. Changes in the percentage of budbreak on single bud cuttings of 'Delaware' grape treated with glutathione. ●: Control, △: 5 mM GSH, □: 5 mM GSSG.

低温処理区 (同 20 °C/15 °C) では早期に休眠誘導されたことから、ブドウの芽の休眠誘導には日長よりも気温の低下が重要であることが再確認できた。

また、気温の低下とともに内生 ABA の増加が自発休眠の誘導に密接に関係していることも知られている (Düring・Alleweldt, 1973; Düring・Bachmann, 1975)。Zeevaart (1977) は、ABA は葉で合成され、その他の部位へ転流するとしている。堀内 (1977) は、生長抑制物質や ABA が気温の変化と運動して葉で合成され、芽に転流・蓄積されることにより休眠が誘導されるが、落葉した後、ABA も徐々に代謝されることにより覚醒に向かうものと推察している。本実験においても、低温処理区で 9 月中旬の完全落葉期以降に萌芽率の低下および ABA 含量の上昇が認められなくなったのは、ABA の合成器官である葉が低温により落下し、ABA 合成が停止したためであると推察された。

グルタチオンについて、Kosower ら (1972) は、GSSG 含量が高いとタンパク質の合成が阻害され、GSH 含量が高いとタンパク質の合成が促進されるとしている。また、アカパンカビにおいて GSSG 含量は休眠に伴い急増し、活発に生育する時期に減少することも認められている (Fahey ら, 1975)。植物では、Esterbauer・Grill (1978)、Guy・Carter (1982) および Guy ら (1984) が、休眠期中に GSH : GSSG 比の変化することを報告しており、Esterbauer・Grill (1978) が針葉樹のドイツトウヒを調査したところ、GSH 含量は、休眠最深期の 10 月頃に低い値を示すが、休眠の覚醒に伴って増加することを見いだしている。一方、Fuchigami・Nee (1987) は、温帯の落葉樹において、GSH : GSSG 比が休眠期間中低く、休眠打破後に増加するとしている。また、筆者ら (東部ら, 1998) は、ブドウ 'デラウェア' の休眠枝をグルタチオン処理した場合、GSH では萌芽が促進されるが、GSSG では萌芽が抑制されることを認めた。本研究の実験 1 において、早期に休眠誘導が認められた低温処理区では休眠が深まるのに伴って早期から GSH 含量が低下し、対照区よりも常に低い値で推移した。また、GSSG 含量は、10 月下旬を除き低温処理区は対照区よりも高い値で推移した。逆に、休眠誘導が認められなかった高温処理区では、対照区と比較すると、処理期間中、GSH 含量は高い値で、GSSG 含量は低い値で推移した。従って、ブドウの芽の休眠誘導においても、グルタチオンがその制御に密接に関連しており、気温の低下に伴う休眠誘導は、グルタチオンが還元型から酸化型へと変化することによって制御されているのではないかと考えられる。さらに、実験 2 において、ABA 処理を行うと GSSG 含量が増加したことから、グルタチオンと休眠誘導物質であると考えられている ABA とは、共働的に休眠誘導に関与している

のではないかと推察された。

摘 要

ブドウの芽の自発休眠誘導をコントロールしていると考えられる低温および ABA と、生体内の酸化還元反応を担っているグルタチオンとの関連を検討した。

1. 休眠誘導が超こっていない時期から、ポット植えブドウ樹を高温処理（昼温 30 °C/夜温 25 °C）および低温処理（同 20 °C/15 °C）したところ、高温処理区で自発休眠は誘導されなかったが、低温処理区では自発休眠が誘導された。

2. 新梢の ABA 含量は、高温処理区で低い値で推移したのに対し、低温処理区では早期に増加した。還元型グルタチオン (GSH) 含量は、高温処理区では高い値で推移したが、低温処理区では処理後から徐々に減少し、低い値で推移した。酸化型グルタチオン (GSSG) 含量は、高温処理区では処理期間中低い値であったのに対し、低温処理区では処理開始後増加した。

3. 休眠誘導期以前にブドウのポット植え個体に ABA 処理を、また、同時期のブドウの切り枝にグルタチオン処理を行ったところ、ABA 処理においては萌芽が著しく抑制され、芽の中の GSSG 含量が増加した。さらに、GSSG 処理した挿し穂ではわずかに萌芽の遅延が認められた。

以上のことから、グルタチオンが休眠誘導と密接に関連していることが示唆された。

引用文献

- 雨木若慶・樋口春三. 1991. テッポウユリ花柱内のグルタチオン代謝に及ぼす受粉の影響. 園学雑. 60 (別 1): 414-415.
- Düring, H. and G. Alleweldt 1973. Der Jahresgang der Abscisinsäure in vegetativen Organ von Reben. *Vitis* 12: 26-32.
- Düring, H. and O. Bachmann 1975. Absciscic acid analysis in *Vitis vinifera* in the period of endogenous bud dormancy by high pressure liquid chromatography. *Physiol. Plant.* 34: 201-203.
- Esterbauer, H. and D. Grill. 1978. Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. *Plant Physiol.* 61: 119-121.
- Fahey, R. C., S. Brody and S. D. Mikolajczyk. 1975. Changes in the glutathione thio-disulfide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging. *J. Bacteriol.* 121: 144-151.
- Fuchigami, L. H. and C. C. Nee. 1987. Degree growth stage model and rest-breaking mechanisms in temperate woody perennials. *HortScience* 22: 836-845.
- Guinn, G., D. L. Brummett and R. C. Beier. 1986. Purification and measurement of abscisic acid and indoleacetic acid by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 81: 997-1002.
- Guy, C. L. and J. V. Carter. 1982. Effect of low temperature on the glutathione status of plant cells. p. 169-179. In: P. H. Li and A. Sakai (eds.) *Plant cold hardiness and freezing stress*. Vol. 2. Academic Press, New York.
- Guy, C. L., J. V. Carter, G. Yelenosky and C. T. Guy. 1984. Changes in glutathione content during cold acclimation in *Cornus sericea* and *Citrus sinensis*. *Cryobiology* 21: 1-11.
- 堀内昭作. 1977. ブドウの芽の休眠現象とその制御に関する研究. 大阪府立大学学位論文.
- 堀内昭作・中川昌一・加藤彰宏. 1981. ブドウの芽の休眠の一般的特徴. 園学雑. 50: 176-184.
- Kosower, N. S., G. A. Vanderhoff and E. M. Kosower. 1972. Glutathione: VIII. The effects of glutathione disulfide on initiation of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 772: 623-637.
- 望岡亮介・東部光伸・堀内昭作・尾形凡生・塩崎修志・河瀬憲次・黒岡 浩・松井弘之. 1996. 数種の日本原産野生ブドウの芽の休眠と内生 ABA および新梢内水分含量との関係. 園学雑. 65: 49-54.
- 中川昌一. 1978. 果樹園芸原論. p. 447-456. 養賢堂. 東京.
- Nigondo, J. 1967. Recherches sur la dormance des bourgeons de la vigne. 4. Discussion des résultats et conclusions. *Ann. Physiol. Veg.* 9: 397-414.
- Rennenberg, H. 1982. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21: 2771-2781.
- 武井和人. 1991. 知っておきたい落葉果樹の休眠メカニズム. ブドウ. 低温遭遇時間と打破薬剤を理解する. 山梨の園芸 40 (10): 28-32.
- Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- 東部光伸・望岡亮介・堀内昭作・尾形凡生・塩崎修志・黒岡 浩. 1998. ブドウの芽の高温による休眠打破時の ACC とグルタチオンの役割. 園学雑. 67: 897-901.
- Westwood, M. N. 1993. Temperate-zone pomology. Third edition. p. 382-385. Timber Press, Oregon.
- Zeevaart, J. A. D. 1977. Sites of abscisic acid synthesis and metabolism in *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.* 59: 788-791.