



Title	トドマツの休眠
Author(s)	柴草, 良悦; SHIBAKUSA, Ryoetsu
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 42(4), 1007-1025
Issue Date	1985-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21162
Type	departmental bulletin paper
File Information	42(4)_P1007-1025.pdf



トドマツの休眠*

柴草良悦**

The Dormancy of *Abies sachalinensis* MASTERS*

By

Ryoetsu SHIBAKUSA**

目 次

1. 緒 言	1007
2. 実験材料および方法	1010
(1) 生長物質の抽出, 精製および生物検定	1010
(2) 芽の原基体の培養	1010
(3) 核酸および蛋白質合成	1010
1) ³ H-uridine および ³ H-leucine の芽の原基体およびトリクロロ酢酸 (TCA)-不溶成分へのとり込み	1011
2) 核酸の抽出	1011
3) 核酸のポリアクリルアミドゲル電気泳動	1013
4) 化 合 物	1013
3. 実験結果	1013
(1) 休眠期の芽および生長期の枝条の生長物質の変化	1013
(2) リボ核酸合成阻害剤および蛋白質合成阻害剤が培養した芽の原基体の 生長に与える影響	1014
(3) 芽の原基体および枝条における核酸および蛋白質合成	1017
1) ³ H-uridine および ³ H-leucine の芽の原基体および TCA-不溶成分へのとり込み	1017
2) 核酸および蛋白質合成	1017
4. 考 察	1021
5. 摘 要	1022
引用文献	1023
Summary	1024

1. 緒 言

温帯や亜寒帯に分布する樹木は、冬季の厳寒期には低温や乾燥にさらされるので、それに耐えられなければ生存していくことはできない。これらの樹木は、休眠によって劣悪な条件に

* 1984年4月30日受理 Received April 30, 1984.

** 北海道大学農学部造林学研究室

** Laboratory of Silviculture, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

耐えて環境に適応してきた。すなわち、厳しい低温や乾燥に耐えるためにより一層休眠が、不可欠のものとして生活史の中に組み込まれている。これに対して好環境下に生育する熱帯植物の多くは、1年間の生育リズムは有するが、明らかな休眠期を持たず、環境条件が適当であれば、生長はある程度連続的に進行するといわれている。

温帯や亜寒帯の樹木は、休眠に入ったのち生長期とは異なった代謝が少しずつ進行して、それによって春の生長のためエネルギーや植物体の構成素材を用意するとともに、低温や乾燥に耐えられるよう耐凍性を高めている。また、細胞の水分を減少させたり、細胞膜等を強化させている。

休眠とは、適当な温度や水分が与えられても生長しない状態をいい、次の2つに大別される。まず、温度環境や光環境などの外的要因が生育に不適当な場合にのみひきおこされるもので、強制休眠 (imposed dormancy) とよばれ、夏の一時的な休眠や次に述べる自発休眠の前後にある浅い休眠である。他の1つは、冬芽あるいはタネなどの休眠器官それ自体に原因があるものと考えられ、自発休眠 (innate dormancy) とよばれている。樹木の休眠は、タネと芽で顕著であり、温帯や亜寒帯の樹木のこれらの自発休眠は、自然条件下で低温 (0~7°C) を一定期間受けて打破される。

休眠と耐凍性とは、密接に関連しており、樹木は、まず自発休眠へ導入し、それが浅くなるにしたがって次第に耐凍性を高める。また、凍結温度によって一層耐凍性を増大する。一方、亜熱帯性のヤナギのように、自発休眠はないが一定の低温を与えることによって (hardening)、耐凍性を高める樹木もある¹³⁾。

自発休眠が破れていく過程で、樹木は耐凍性を次第に高めていくが、多くの植物で一般的に認められる物質代謝の変化を以下箇条がきで述べる。

- a. 生長抑制物質 (とくにアブサイシン酸 (ABA)) の減少^{5,8)}
- b. リボ核酸 (RNA) (とくに可溶性 RNA) の合成⁹⁾
- c. 可溶性蛋白質の合成²²⁾
- d. アルギニン、プロリンなどの特定アミノ酸の増加^{13,14)}
- e. でんぷんの糖化^{13,14)}
- f. 中性脂質の減少とリン脂質の増加²⁵⁾
- g. 解糖系からペントースリン酸回路への呼吸系の転換¹²⁾

これらの一連の物質代謝にみられるように、樹木は秋から厳冬に向けて、浸透圧を高め細胞質を増加させ、膜を新生するなどのために重要な代謝が活発化し、耐凍性を高めていく。すなわち、厳冬期に一定時間の低温 (0~7°C) を受けた樹木は、ゆっくり生長抑制物質を減少し、生長促進物質の働きうる素地を作り、酵素・核酸代謝が進み、耐凍性を高め、翌春の開芽・伸長の準備がおこなわれる。

トドマツの芽の休眠や耐凍性については、いまだ不明のことが多いが、明らかになったこ

とを以下に述べる。

札幌付近では、トドマツは5月上旬に開芽し、6月下旬には冬芽を形成するが、上長生長は7月下旬頃まで続く。冬芽を形成したのは、冬芽の中で翌春のための葉原基を作っていて、それが終了して9月下旬頃自発休眠に入る^{20,21)}。また、その頃、芽の原基体の下部にクラウン組織が発達する²¹⁾。

トドマツの冬芽形成や上長生長の停止は、前述のように1年の中で早い時期におこるので、これらの現象には日長(短日)や気温が直接関連しているのではなく、樹木自体の性質として、枝条が前年に用意した葉原基を展開し終えたら、自然に冬芽形成すると考えられる。しかし、極端な気温や土壌水分の変化は、生長を停止させ冬芽を形成させることもある。

いったん休眠に入ったトドマツは、低温(0~7°C)や長日条件によって休眠から覚醒する⁴⁾。長日は、葉に感応して葉の生長抑制物質を減少させ⁶⁾、それが送られる冬芽では、結果的に生長抑制物質が減少すると考えられる。低温は冬芽で直接感応し、この場合も生長抑制物質が減少すると考えられる。休眠が打破されたかどうかは、樹木を温室に持ち込んで適当な温度と水分を与えて開芽するかどうかで判断する。トドマツの休眠の深さは、樹齢によって異なり、若い苗木ほど休眠は浅い。

生長抑制物質の中で最も抑制作用の強いのは、アブサイシン酸(ABA)であるとされ、他にフェノール類も多く、その中の1つにD-カテキンがあり、両者は休眠期のトドマツ葉に存在する^{15,16)}。

芽の休眠を詳しく調べる目的で、冬芽の芽の原基体を取り出し、無菌培養して生長物質の反応をみた。オーキシンの α -ナフタレン酢酸(NAA)は、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でやや生長を抑制した²¹⁾。

ジベレリン $\text{A}_3(\text{GA}_3)$ とエスレル(植物体内に入ってエチレンを発生する)は、生長に影響を与えなかったが、培養中に発生するエチレン(C_2H_4)を除去すると生長を抑制した¹⁹⁾。また、自発休眠中と他発休眠中の芽の原基体を取り出し C_2H_4 発生量を調べたところ、後者の方がより多く C_2H_4 を発生した¹⁹⁾。一方、サイトカイニンの6-ベンジルアデニン(BA)は、芽の原基体の生長を著しく抑制した¹⁹⁾。

トドマツの耐凍性を調べた実験によると、苗木では、9月下旬および10月上旬の耐凍度は-3°Cであったが、12月上旬に-20~-25°Cと最大となり、その後、積雪下の苗木は、次第に耐凍性を低下させ、5月上旬に-3°Cとなった³⁾。

また、植栽後18~20年生のトドマツの当年生枝の耐凍度は、9月下旬で-5°C、2月下旬で-30°Cとなり、その後減少し4月下旬には-3°Cとなった²⁾。

本研究では、自発休眠から他発休眠、さらに開芽期における冬芽の生長物質の変化、培養した芽の原基体の生長に与えるRNA合成阻害剤のActinomycin D(Act. D)、蛋白質合成阻害剤のCycloheximide(Ch)およびABAの影響、休眠期の芽の原基体および生長期の枝条での核酸合成、蛋白質合成を調べた。

本研究を進めるに際し、終始懇切なご指導を頂いた北海道大学農学部造林学教室故武藤憲由教授に深甚な謝意を表す。核酸および蛋白質の実験について絶えず有益なご助言を頂いた北海道大学理学部生物学科谷藤茂行教授に深謝する。また、多くの助言や援助を頂いた造林学教室の皆さんに感謝する。

2. 実験材料および方法

実験材料として、生長物質の抽出、精製および生物検定には、北海道大学苫小牧地方演習林幌内事業区40林班に造林されたトドマツを用い、それ以外の実験には演習林実験苗畑に植栽されたトドマツ造林木を用いた。

(1) 生長物質の抽出、精製および生物検定

22年生トドマツから冬芽を1978年10月15日、1979年1月22日、3月8日、5月4日および6月1日に採取し、芽の原基体、芽りんおよび芽の基部の枝に分離した。遊離の生長物質の抽出、精製方法は、すでに報告した通りである^{17,18)}。

結合体の生長物質の抽出、精製方法は以下の通りである。遊離の生長物質を酢酸エチルで抽出した残りの水層を1N NaOHでpH 11.0とし、65°C、2時間加水分解したのち、水溶液を再びpH 3.0まで下げて、酢酸エチルで抽出した。その後は、遊離の生長物質の場合と同様に精製した。生長物質の生物検定は、アベナ伸長試験によった¹⁷⁾。

(2) 芽の原基体の培養

実験には、苗木の枝の頂芽を用いた。

Act. DとChの実験では、1979年10月21日、1980年1月21日および3月20日に枝を採取した。ABA実験では、1979年10月14日と1980年1月20日に枝を採取した。

芽りんを取り除いた枝の頂芽を1%の次亜塩素酸ソーダ(0.05%の展着剤を含む)で10分間殺菌したのち、数回無菌水で洗った。無菌的に芽りんを取り除き、クラウン組織から下を切り離し、芽の原基体を取り出した。芽の原基体の切断面を下に、25 mlの寒天培地の入った100 ml エーレンマイヤーフラスコに2個ずつ植えた。

生長物質を加えた培地あるいは基本培地は、1N HClあるいはNaOHでpH 5.5に調整したのち、120°C/kg/cm²のオートクレイブで15分間殺菌した。トドマツの芽の原基体を培養する場合の基本培地は、RISSER & WHITE's 培地が適していた¹⁹⁾。

ABAの実験では、培地に0.1 μg/ml~100 μg/mlの濃度になるようにABAを加えた。Act. Dの実験では、濃度1 μg/ml~200 μg/ml、Chの実験では、濃度0.1 μg/ml~100 μg/mlの水溶液を作成し、芽の原基体を3時間浸した。処理した芽の原基体を培地に植えたのち、1,000ルクスの照度、12時間日長、25°C下で42日間培養した。

(3) 核酸および蛋白質合成

休眠期の芽の原基体と生長期の枝条の核酸および蛋白質合成を調べた。冬芽および枝条の

採取は、1983年5月25日、10月22日、1984年1月28日および3月25日におこなった。RNA合成を調べるために ^3H -uridineを用い、蛋白質合成を調べるために ^3H -leucineを用いた。

1) ^3H -uridine および ^3H -leucine の芽の原基体およびトリクロール

酢酸 (TCA)-不溶成分へのとり込み

芽の原基体への取り込みを調べるために、 ^3H -uridine ($100 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) および ^3H -leucine ($25 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) をそれぞれ含む 5 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に、芽の原基体を 20°C 、 $2\sim 10$ 時間おいた。その後、芽の原基体を 0.5% のラウリル硫酸ナトリウム (SLS) で 30 秒間洗い、さらに無菌水で数回洗った。それらを上記の緩衝液でホモジナイズし、一部を取って NCS ゲル可溶化剤を加えて 2 時間加熱し、さらに 10 ml のシンチレーター (1 l のトルエン + 4 g の PPO + 100 mg の POPOP) を加えて、液体シンチレーションスペクトロメーターで放射能を計測した。

TCA-不溶成分への ^3H -uridine の取り込みを調べるために、前述のように処理した芽の原基体をそれぞれ 10% の冷 TCA 液でホモジナイズした。 ^3H -leucine の場合は、 90°C で 10 分間処理し、tRNA-アミノ酸を取り除いた。これらの溶液を glass fiber filter (Whatman GF/C) 上で、吸引しながら 5% の冷 TCA で洗った。さらに冷エタノール-エーテル液で洗ったのち、フィルターを 80°C で 30 分間乾燥し、上記のシンチレーターを加えて放射能を測定した。

2) 核酸の抽出

核酸抽出の方法は、TAKAIWA と TANIFUJI²³⁾ の用いた方法によっている。芽の原基体を ^3H -uridine ($100 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) の 5 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) で 8 時間無菌的にラベルしたのち、 0.5% SLS と無菌水で洗った。その後、芽の原基体を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に 1% SLS, polyvinyl sulfuric acid K salt ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$), 0.2% の diethylpyrocarbonate を含んだ水溶液とクロロフォルム-フェノール液との $1:1$ の混合液でホモジナイズした。クロロフォルム-フェノール液は、クロロフォルムとフェノール液 (500 g フェノール + 70 ml の m-クレゾール + 0.5 g の 8-hydroxyquinoline + 55 ml の水) の $1:1$ の混合液である。遠心分離 ($11,000 \times g$, 15 分間, 0°C) ののち、水層をパスツールピペットで集めて、クロロフォルム-フェノール液で 3 回蛋白質を除去した。水溶液に 0.1 M になるように NaCl を加え、 2.5 倍のエチルアルコールを加えて、 -20°C で核酸を沈澱させた。沈澱物を $2,900 \times g$, 10 分間, 0°C の遠心分離で集めた。

得られた核酸の一部を用いて、poly A (-) RNA と poly A (+) RNA を分離した。すなわち、oligo dT-cellulose により、 0.5 M KCl の 0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で、poly A (-) RNA を溶出した。さらに、同緩衝液で十分洗ったのち、 0.01 M のトリス-塩酸緩衝液で poly A (+) RNA を溶出した。得られた poly A (-) RNA および poly A (+) RNA を UV 260 nm の吸収により定量し、さらに (3)-1) に述べた方法で TCA により沈澱させ、放射能を測定した。

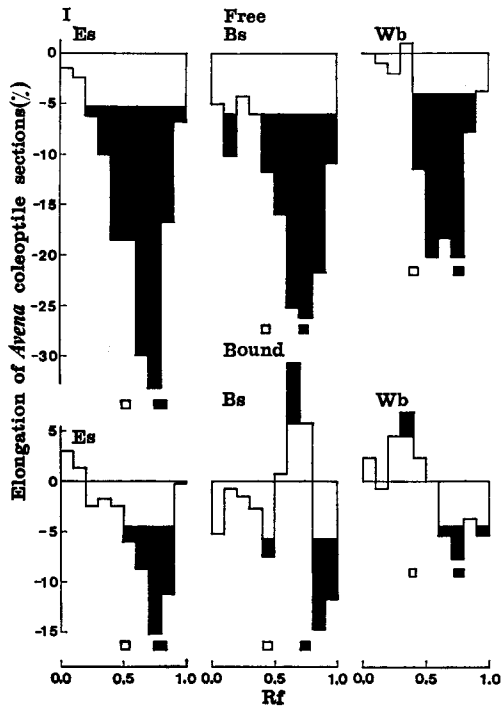


Fig. 1-(1)

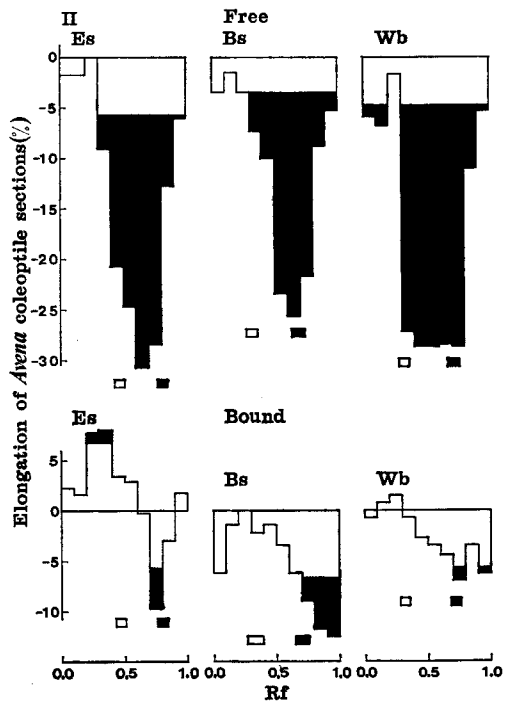


Fig. 1-(2)

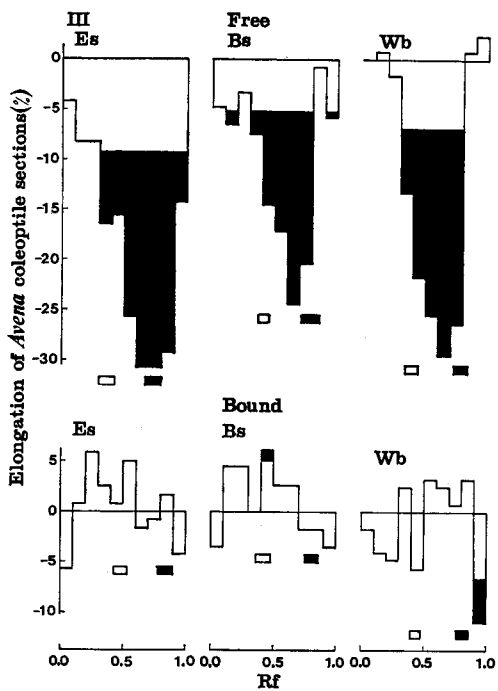


Fig. 1-(3)

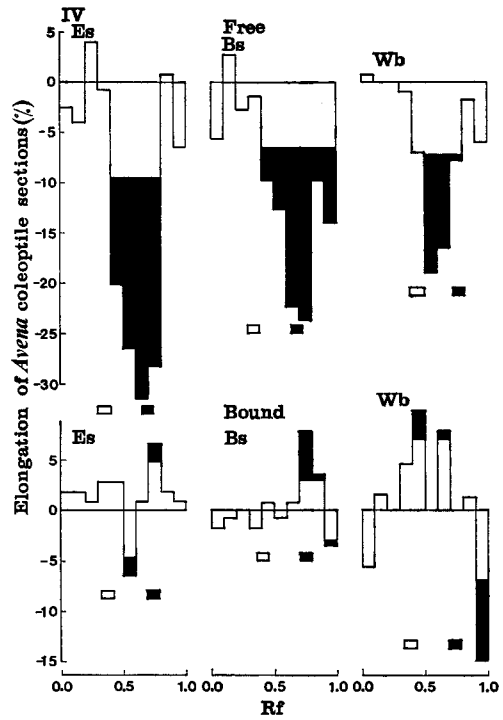


Fig. 1-(4)

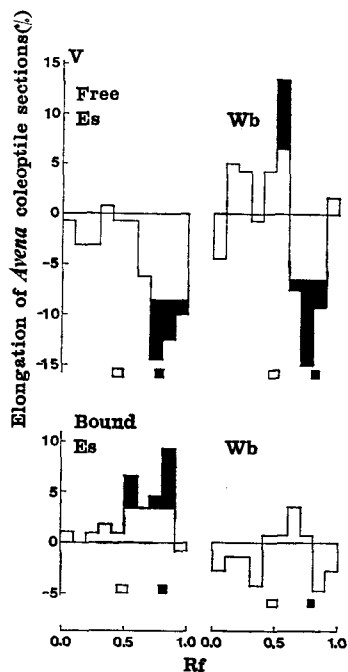


Fig. 1-(5)

Fig. 1-(1)-(5). The change of growth substances in buds separated into embryonic shoots (Es), bud scales (Bs) and woody bud bases (Wb), and in shoots in the growing period were investigated by *Avena* straight growth test. The collection dates were Oct. 15 (I), Jan. 22 (II), Mar. 8 (III), May 4 (IV) and June 1 (V).

□ Authentic indoleacetic acid
 ■ Authentic abscisic acid

3) 核酸のポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、LOENINGの方法¹⁰⁾によった。すなわち、核酸を10%のしょ糖を含む電気泳動緩衝液に溶解し、5%のビスアクリルアミド(アセトンで再結晶)を含む2.5%および7.5%のアクリルアミド(クロロフォルムで再結晶)で9.5 cm×0.5 cmのアクリル合成樹脂管により分離した。電気泳動は、30 mMの NaH_2PO_4 および1 mMの $\text{Na}\cdot\text{EDTA}$ を含んだ36 mMのトリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)で、20分間、2 mA/tube+40~90分間、5 mA/tubeでおこなった。

展開したゲルを Cosmo densitometer (重水素ランプ付)によって260 nmの波長で吸収を調べた。また、展開したゲルをアルミニウムフィルム上で -20°C で凍結し、スライサーにより2 mm間隔で切断した。1切片に0.6 mlの90% NCS ゲル可溶化剤を加え、 60°C 、2.5時間加熱し、前述のシンチレーターを加えて放射能を測定した。

4) 化合物

[$5\text{-}^3\text{H}$] uridine (25~30 Ci/mmol) と L-[4, 5- ^3H] leucine (45~70 Ci/mmol) を日本アイソトープ協会から購入した。電気泳動における分子量のマーカースとして baker yeast transfer RNA (4 S tRNA), *E. coli* 5S ribosomal RNA (rRNA), *E. coli* 23 S+16 S rRNA を Boehringer Mannheim から購入した。

3. 実験結果

(1) 休眠期の芽および生長期の枝条の生長物質の変化

冬芽を芽の原基体 (Es), 芽りん (Bs) および芽の基部の枝 (Wb) にわけて、それらにある遊離および結合体の生長物質の変化を調べた結果を図で示すと Fig. 1-(1)~(5) となる。

10月15日、1月22日の芽の原基体、芽りんおよび芽の基部の枝では多量の遊離の growth inhibitors があり、3月8日から開芽期の5月4日にかけて、それらは著しく減少する。生長最盛期の6月1日では、遊離の growth inhibitors は非常に少なく、growth promoters は芽の基部の枝にみられる。

結合体の growth inhibitors は、10月15日から1月22日にかけていずれの部分でも減少し、3月8日ではほとんどみられなくなる。6月1日の芽の原基体ではかなりの結合体の growth promoters がみられる。また、marker の ABA により、最も強い growth inhibitor は ABA と考えられた。

(2) リボ核酸合成阻害剤および蛋白質合成阻害剤が培養した芽の原基体の生長に与える影響

Act. D は、低濃度で rRNA 合成、高濃度で他の RNA 合成も阻害し、Ch は蛋白質合成を阻害するとされている。10月21日、1月21日および3月20日に採取した芽の原基体の生長に対する Act. D および Ch の影響の試験結果を示すと Tables 1~3 となる。

Table 1. Effects of Actinomycin D (Act. D) and Cycloheximide (Ch) on the growth of embryonic shoots collected on Oct. 21

	Axis length (mm)	Fresh weight (mg)	Development of needle primordia (%)	Callus formation (%)	Browning (%)
Original embryonic shoots	1.9±0.3	4.1± 1.7			
Control	4.5±1.0	37.7±14.1	95	48	10
Act. D 1 µg/ml	4.4±1.0	38.5±15.2	91	74	4
10	5.4±1.9	44.2±19.2	95	65	5
100	4.5±1.0	40.3±16.5	96	48	0
200	4.7±0.9	39.6±12.1	100	62	0
Ch 0.1	5.1±2.0	40.8±16.5	95	63	0
1	4.7±1.2	42.7±13.2	100	57	10
10	4.1±0.8	32.6±13.4	75	31	19
100	3.9±0.9	33.3±12.0	78	0	33

Table 2. Effects of Act. D and Ch on the growth of embryonic shoots collected on Jan. 21

	Axis length (mm)	Fresh weight (mg)	Development of needle primordia (%)	Callus formation (%)	Browning (%)
Original embryonic shoots	2.4±0.2	6.2± 1.4			
Control	6.1±1.8	79.1±31.9	100	83	0
Act. D 1 µg/ml	6.1±1.7	73.2±30.4	100	91	0
100	6.3±1.5	84.2±35.0	100	65	0
200	6.3±2.0	72.3±25.0	96	78	4
Ch 0.1	6.2±1.9	73.3±29.6	100	83	0
1	6.8±2.2	85.0±39.7	100	78	0
10	6.1±2.5	67.0±37.6	91	39	9
100	3.6±1.4	30.4±16.8	50	0	30

Table 3. Effects of Act. D and Ch on the growth of embryonic shoots collected on Mar. 20

	Axis length (mm)	Fresh weight (mg)	Development of needle primordia (%)	Callus formation (%)	Browning (%)	Withered (%)
Original embryonic shoots	1.9±0.3	4.8± 1.6				
Control	4.9±1.2	58.2±15.9	100	87	0	0
Act. D 1 µg/ml	5.4±1.1	62.8±17.7	100	92	9	4
10	5.1±1.2	66.8±20.9	96	91	0	0
100	4.8±1.5	58.6±21.0	95	60	20	13
200	4.0±1.0	35.8±16.4	90	25	50	13
Ch 0.1	5.0±1.1	67.7±16.0	100	87	0	4
1	4.8±1.2	61.6±17.2	100	88	0	0
10	3.7±0.8	31.8± 9.4	64	59	23	4
100	—	—	—	—	—	96

Table 4. Effects of abscisic acid (ABA) on the growth of embryonic shoots collected on Oct. 14 and Jan. 20

1) Collected on Oct. 14

	Axis length (mm)	Fresh weight (mg)	Development of needle primordia (%)	Callus formation (%)	Browning (%)	Withered (%)
Original embryonic shoots	1.6±0.2	2.9± 0.6				
ABA 0 µg/ml	4.2±1.0	38.9±17.2	100	68	0	0
0.1	3.6±0.8	27.3±11.8	91	36	0	8
1	3.4±0.5	22.8± 5.7	50	36	5	0
10	2.6±0.4	13.3± 3.9	0	18	16	0
100	2.3±0.3	10.0± 2.1	0	0	55	48

2) Collected on Jan. 20

	Axis length (mm)	Fresh weight (mg)	Development of needle primordia (%)	Callus formation (%)	Browning (%)	Withered (%)
Original embryonic shoots	2.0±0.3	4.8± 1.5				
ABA 0 µg/ml	5.1±2.0	60.1±26.9	100	100	0	0
0.1	5.1±1.7	55.1±25.2	100	88	0	0
1	3.9±0.8	31.4±13.9	64	86	18	4
10	3.6±0.5	20.6± 4.6	11	61	11	25
100	2.9±0.6	15.2± 5.0	10	30	70	58

10月21日の芽の原基体においては、Act. Dの1~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した区では、対照区と比較して差は認められない。Chの0.1~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した区では差は認められないが、10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した区では、生長(軸長、生重量、葉原基の発達)はやや抑制されている。

1月21日の芽の原基体においては、10月21日と同様の傾向が認められ、とくにCh 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での生長抑制が、10月21日のものより著しい。3月20日の芽の原基体では、Act. Dの200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でもかなり生長抑制が認められ、Chでは10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも生長抑制が著しく、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではまったく生長が認められずほとんど枯死した。

10月14日および1月20日採取の芽の原基体に与えるABAの影響の試験結果を示すとTable 4となる。10月14日および1月20日の芽の原基体の生長は、ABAの濃度が0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と増すにつれ、著しく軸長、生重量、葉原基の発達が抑制された。

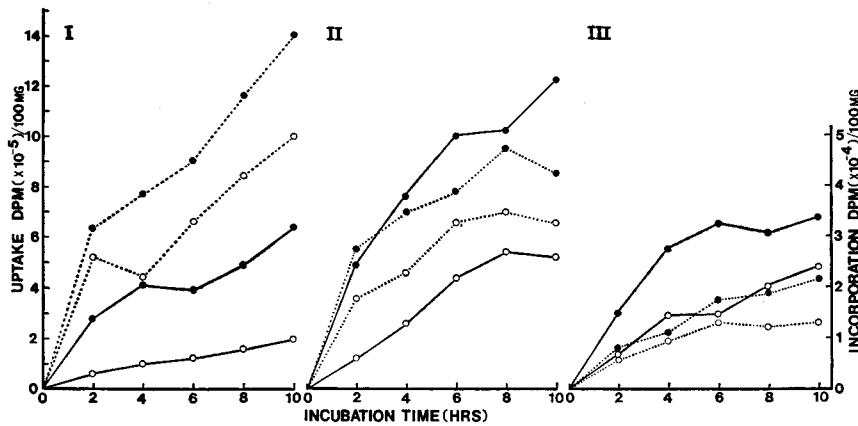


Fig. 2. The uptake (●) of radioactive precursors into embryonic shoots (100 mg fresh weight) and incorporation (○) of radioactive precursors into TCA-insoluble materials of embryonic shoots (100 mg f.w.) in the incubation time of 2~10 hrs, were investigated. The collection dates were Oct. 22 (I), Jan. 28 (II) and Mar. 25 (III). As radioactive precursors, ^3H -uridine (—) were used for RNA synthesis and ^3H -leucine (···) were used for protein synthesis.

Table 5. The ratio of incorporation per uptake of radioactive precursors

Collected dates	Radioactive precursors	Incubation time (hrs)					Average
		2	4	6	8	10	
Oct. 22	^3H -uridine	0.010	0.014	0.016	0.016	0.015	0.014
	^3H -leucine	0.041	0.029	0.037	0.037	0.036	0.036
Jan. 28	^3H -uridine	0.012	0.018	0.022	0.027	0.021	0.020
	^3H -leucine	0.033	0.033	0.043	0.037	0.039	0.037
Mar. 25	^3H -uridine	0.023	0.027	0.022	0.033	0.036	0.028
	^3H -leucine	0.045	0.044	0.037	0.032	0.031	0.038

(3) 芽の原基体および枝条における核酸および蛋白質合成

1) ^3H -uridine および ^3H -leucine の芽の原基体および TCA-不溶成分へのとり込み

10月22日, 1月28日および3月25日に採取した芽の原基体への ^3H -uridine および ^3H -leucine のとり込み (uptake) および TCA-不溶成分へのとり込み (incorporation) の結果を図示すると Fig. 2 となる。また, この試験結果から, uptake に対する incorporation の割合を算出して表示すると Table 5 となる。

芽の原基体への ^3H -uridine の uptake と TCA-不溶成分への incorporation は, incubation の時間が長いほど増加するが, 採取月日ごとにみると10月22日から1月28日にかけて増大し, 3月25日では芽の原基体への uptake はやや少なくなるが, TCA-不溶成分への incorporation は, 1月28日とほとんど変わらない。

芽の原基体への ^3H -leucine の uptake と TCA-不溶成分への incorporation は, 10月22日で大きく, 1月28日, 3月25日になるにつれて漸減した。しかし, uptake に対する incorporation の割合は, ^3H -uridine では, 10月22日が平均0.014, 1月28日が平均0.020, 3月25日が平均0.028と漸増した。 ^3H -leucine では, 平均0.036~0.038で採取月日によって差は認められなかった。

2) 核酸および蛋白質合成

休眠期 (10月22日, 1月28日および3月25日) に採取した芽の原基体に ^3H -uridine を8時間とり込ませ, 抽出した核酸を2.5%の濃度のポリアクリルアミドゲルで, 20分間, 2 mA/

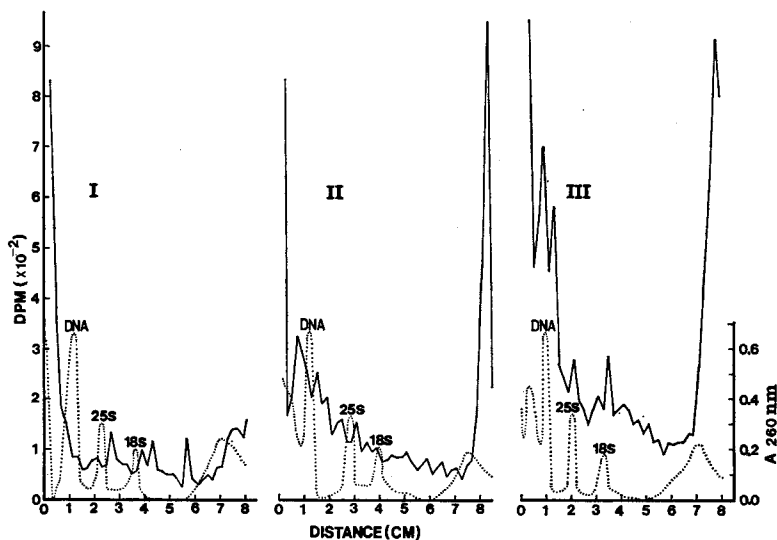


Fig. 3. The gel electrophoresis of nucleic acids from embryonic shoots labeled with ^3H -uridine for 8 hrs on polyacrylamide gels (2.5%) for 20 min at 2 mA/tube and for 90 min at 5 mA/tube were undertaken. The collection dates were Oct. 22(I), Jan. 28(II) and Mar. 25(III). The dotted lines show the absorbance at 260 nm and solid lines show the radioactivity as dpm/2 mm gel slices.

tube+90分間, 5 mA/tube で電気泳動した結果を図示すると Fig. 3 となる。また, 5月25日の芽の原基体からの核酸について, 20分間, 2 mA/tube+90分間, 5 mA/tube および 20分間, 2 mA/tube+40分間, 5 mA/tube で電気泳動した結果は, Fig. 4 である。休眠期の芽の原基体

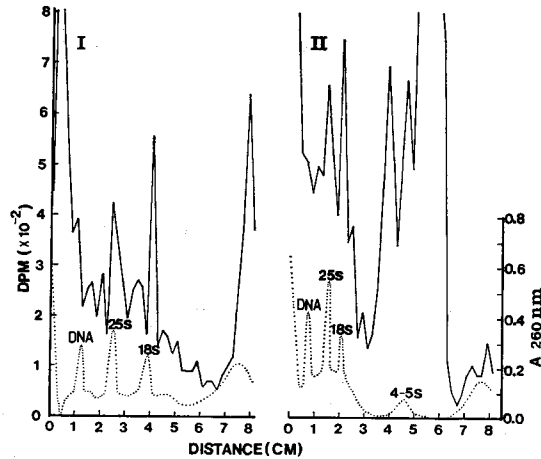


Fig. 4. The gel electrophoresis of nucleic acids from shoots collected on May 25 on polyacrylamide gels (2.5%) for 20 min at 2 mA/tube and 90 min at 5 mA/tube (I), and for 20 min at 2 mA/tube and 40 min at 5 mA/tube (II) were undertaken. The explanation is indicated in Fig. 3.

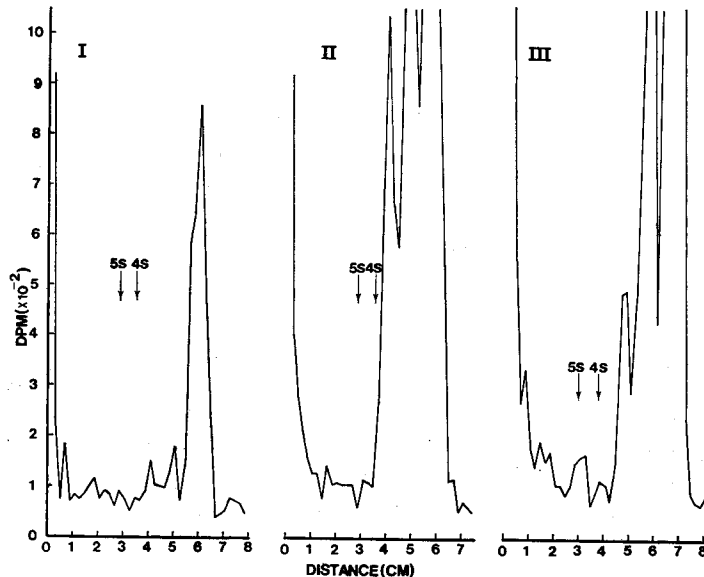


Fig. 5. The gel electrophoresis of nucleic acids from embryonic shoots collected on Oct. 22 (I), Jan. 28 (II) and Mar. 25 (III) on polyacrylamide gels (7.5%) for 20 min at 2 mA/tube and for 60 min at 5 mA/tube were undertaken. The positions of *E. coli* 5S rRNA and 4S tRNA from baker yeast in gels were indicated by arrows. The explanation is indicated in Fig. 3.

からの核酸を7.5%のゲル濃度で、20分間、2 mA/tube+60分間、5 mA/tube 電気泳動した結果を示すと Fig. 5 となる。

10月22日から1月28日採取の芽の原基体では、25S, 18S および 5S rRNA や 4S tRNA の合成は認められない (Fig. 3)。しかし、tRNA より低分子の化合物に ^3H -uridine のとり込みが認められ、10月22日から1月28日にかけて非常に増加する (Fig. 5)。3月25日の芽の原基体では、25S, 18S および 5S の rRNA 合成が認められる (Figs. 3, 5)。また、高分子の核酸すなわち、 2.4×10^6 , 2.0×10^6 dalton の核酸合成が認められる (Fig. 3)。これらは、rRNA の前駆体と考えられる。また、tRNA の合成も認められた (Fig. 5)。3月25日の芽の原基体においても、低分子の化合物への ^3H -uridine とり込みが認められた。

5月25日の芽の原基体では、25S および 18S の rRNA の合成が著しく、4-5S RNA の合成は、低分子化合物の放射能と重なって判然としなかった (Fig. 4)。1月28日の芽の原基体の poly A (-) RNA および poly A (+) RNA の電気泳動の結果を示すと Fig. 6 となる。tRNA より低分子で ^3H -uridine のとり込みがある物質は、poly A (-) 区分に溶出する。poly A (+) RNA は、高分子から低分子へかけてみられた。

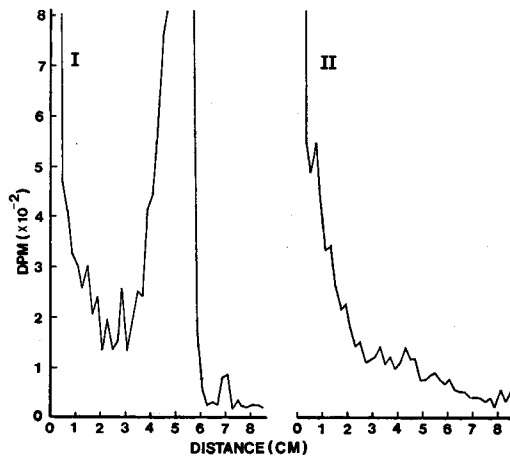


Fig. 6. The gel electrophoresis of poly A(-) RNA (I) and poly A(+) RNA (II) separated by oligo dT-cellulose in RNAs from embryonic shoots collected on Jan. 28 on polyacrylamide gels (2.5%) for 20 min at 2 mA/tube and 40 min at 5 mA/tube (I) and for 20 min at 2 mA/tube and 90 min at 5 mA/tube (II) were undertaken. The explanation is indicated in Fig. 3.

ポリアクリルアミドゲルによって核酸を分離し、UV 吸収から、デオキシリボ核酸 (DNA)、25S および 18S rRNA, 4-5S RNA の量を算出し、全核酸に対する百分率で示すと Table 6 となる。10月22日から3月25日にかけては、芽の原基体で細胞分裂は停止しているため、DNA 合成はおこなわれていないと考えられる。秋に合成された DNA が、休眠期の芽の原基体の細胞に多量に存在していると考えられる。一方、5月25日では活発な核酸合成が認められ

るが、DNA より RNA の割合が多いのは、DNA より RNA の合成が盛んであることを示していると考えられる。

Table 6. The percentage of nucleic acids from the UV absorption in the polyacrylamide gels in Figs. 3 and 4.

Collected dates	DNA	RNA			Total
		25 S	18 S	4-5 S	
Oct. 22	52.6	21.2	13.8	12.4	100
Jan. 28	53.2	19.2	14.4	13.2	100
Mar. 25	56.0	21.8	11.8	10.4	100
May 25	26.3	38.7	19.9	15.0	100

Oligo dT-cellulose によって分離した Poly A (-) RNA と poly A (+) RNA を TCA により沈澱させ、放射能を測定し採取月日ごとに芽の原基体および枝条の生重量 1 g あたりとして示すと Table 7 となる。

Table 7. The rates of RNA synthesis in the embryonic shoots (1 g f. w.)

Collected dates	(Poly A(-)RNA+Poly A(+)RNA) synthesized		Poly A(+)RNA synthesized	
	dpm $\times 10^{-3}$	Specific radioactivity dpm $\times 10^{-3}$ /mg	dpm $\times 10^{-3}$	Specific radioactivity dpm $\times 10^{-3}$ /mg
Oct. 22	130.9	108.8	49.3	519.6
Jan. 28	594.1	261.5	225.0	1648.6
Mar. 25	478.8	270.0	30.7	545.2
May 25	196.3	196.0	39.3	352.7

全 RNA (poly A (-)RNA+poly A (+)RNA) の合成は 10 月 22 日の $130.9 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ から、1 月 28 日では $594.1 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ と増加し、3 月 25 日では $478.8 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ とやや減少したが、比放射能 (dpm/mg RNA) は 10 月 22 日から 1 月 28 日へかけて増加し、3 月 25 日では 1 月 28 日と変わらない。5 月 25 日の枝条では、全 RNA 合成は $196.3 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ 、比放射能は $196.0 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ と減少している。5 月 25 日の枝条は、生長最盛期で含水率が非常に大きくなっているため、重量あたりの核酸が減少していると考えられた。

poly A (+)RNA の合成は、10 月 22 日が $49.3 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ 、3 月 25 日が $30.7 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ で、これらに比較して 1 月 28 日では $225.0 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ と非常に高い。また、比放射能は 10 月 22 日の $519.6 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ 、3 月 25 日の $545.2 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ に対して、1 月 28 日では $1648.6 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ と非常に高くなっている。この理由は不明である。5 月 25 日の poly A (+)RNA 合成は、 $39.3 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ 、比放射能は $352.7 \text{ dpm} \times 10^{-3}$ であった。休眠期のトドマツの芽の原基体における poly A (+) RNA 合成については、不明のことが多く今後も実験を重ねたい。

4. 考 察

自発休眠 (9月下旬から11月下旬) から他発休眠にかけては、多くの遊離の growth inhibitors が芽の原基体に存在して休眠期の芽の活動を抑制していると考えられる。また、芽りんや芽の基部の枝にも、多量の遊離の growth inhibitors が認められ、これらが芽の原基体へ移動して芽の休眠を調整していることも考えられる。このような現象は、はしばみの種子の胚、種皮において認められている⁷⁾。遊離の growth inhibitors は、他発休眠から開芽・伸長にかけて次第に減少する。一方、結合体の growth inhibitors は、10月15日と1月22日でかなり認められ、3月8日ではほとんど認められなくなる。

以上の事実から、自発休眠はもちろん他発休眠においても、芽の原基体の休眠に growth inhibitors が深く関わっていることは疑いない。

ところで、生長を抑制された芽の原基体の中で休眠期独自の代謝が少しずつ進行している。すなわち、その代謝によって生ずるエネルギーや物質が、本来、春の開芽、伸長のためのエネルギーとなり素材となると考えられるが、厳冬期を休眠して過ごす温帯や亜寒帯の樹木は、同時に、それによって著しく耐凍性を高めている。このような細胞の充実は、次のような環境条件によってもたらされる。すなわち、厳冬期に一定時間の低温 (0~7°C) を受けた樹木は、ゆっくり growth inhibitors を減少して、growth promoters の働きうる素地を作り、代謝を進行させてやがて開芽・伸長のための積極的な活動が開始されると考えられる。

培養した芽の原基体に与える Act. D および Ch の影響をみると、自発休眠の10月21日、1月21日では Act. D は生長を抑制しなかった。しかし、3月20日では 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でやや抑制作用が認められた。Act. D は主に rRNA 合成を抑制するので、10月21日、1月21日では生長のための rRNA などの合成がほとんど認められず、一方、3月20日には rRNA などの RNA 合成がおこなわれていると推定された。Ch では、10月21日、1月21日および3月20日では 10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生長抑制作用があり、次第に抑制作用は著しくなる。この事実は、蛋白質合成が休眠中の芽の原基体でおこなわれており、次第に盛んになることを示している。

ABA の芽の原基体の生長に対する影響は、自発休眠および他発休眠ともに抑制作用があり、その作用は濃度が増すにつれて著しく、また Ch の生長抑制作用に類似しているため、ABA は、すくなくとも蛋白質合成を阻害していると考えられる。また、ABA が RNA 合成阻害に働いているかどうかはこの実験から不明である。

10月22日から1月28日にかけて、tRNA より低分子の化合物の合成は著しく増大するが、rRNA、tRNA のはっきりした合成は認められない。tRNA より低分子の化合物は、nucleotide と考えられ、低温下での代謝のエネルギー源や核酸合成の素材になるとされている^{1,11)}。

3月25日から5月25日にかけては、25S、18S、5S rRNA、4S tRNA および rRNA の

前駆体と推定される高分子核酸などの合成が認められた。

以上の実験結果から、2つの問題点が提起される。1つの問題点は、10月22日から1月28日にかけて rRNA, tRNA の明瞭な合成は認められないが、蛋白質合成はおこなわれていることである。既存の rRNA, tRNA が蛋白質合成に用いられている可能性がある。

他の問題点は、3月25日から5月25日において、rRNA, tRNA, poly A (+) RNA の明瞭な合成である。

最初の問題点では、休眠期の樹木の耐凍性を高める段階で可溶性蛋白質の増加²²⁾、糖類の増加²⁴⁾が認められ、これらの物質が細胞内の浸透圧を高めるのに役立っている。本実験でみられた蛋白質合成が可溶性蛋白質であるかどうかは今後の研究課題である。低温下の初期のでんぶんの糖化は、酵素の活性化(フォスフォリラーゼ)が考えられ²⁴⁾、この過程には蛋白質(酵素)合成は、直接に関係しないのかもしれない。

2つめの問題点は、3月25日から5月25日にかけての rRNA, tRNA, poly A (+) RNA の合成である。3月25日の冬芽は、耐凍性を次第に減少している時期であり、上記の核酸合成は開芽・伸長のための蛋白質(酵素)合成に関係すると考えられる。培養した芽の原基体の生長に与える Act. D や Ch の抑制作用からもこの事実は推定される。

5. 摘 要

自発休眠(9月下旬から11月下旬)、他発休眠(12月上旬から4月下旬)と生長期(5月上旬から7月上旬)に、採取したトドマツの冬芽と枝条の生長物質の変化、無菌培養した芽の原基体の生長に対する生長物質の影響および採取した芽の原基体における核酸、蛋白質合成を調べた。得られた結果をまとめると次のようになる。

1) アベナ伸長試験により、芽の原基体、芽りんおよび芽の基部の枝に分けた休眠期の芽および生長期の枝条の生長物質の変化を調べた。休眠期の芽の原基体の遊離の growth inhibitors は、多量に認められ開芽までに次第に減少した。また、休眠期の芽りんや芽の基部の枝にも多量の growth inhibitors が認められた。結合体の growth inhibitors は、休眠期に認められたが、3月上旬には認められなくなる(Fig. 1-(1)~(5))。遊離の growth inhibitors の中で最も強い抑制作用をもつ物質は、abscisic acid (ABA) と考えられた。

2) 休眠期の芽の原基体を採取して、無菌的に培養し、その生長に対する RNA 合成阻害剤の Actinomycin D (Act. D)、蛋白質合成阻害剤の Cycloheximide (Ch)、生長抑制物質の ABA の影響を調べた(Tables 1~4)。自発休眠および他発休眠前半にかけて、Act. D の影響はなかったが、他発休眠後半の3月20日では 200 $\mu\text{g/ml}$ で芽の原基体の生長を抑制した。一方、Ch は 10~100 $\mu\text{g/ml}$ ですべての採取月日において生長抑制し、3月20日で最も著しく抑制した。培養した自発休眠中採取の芽の原基体では、蛋白質合成がおこなわれ、さらに3月20日の芽の原基体では、かなりの RNA 合成や蛋白質合成がおこなわれていると推定された。

ABA は、すべての採取月日の芽の原基体の生長を著しく抑制した。ABA の抑制作用は、Ch の抑制作用に類似しているため、ABA は少なくとも蛋白質合成を抑制していると考えられた。

3) 芽の原基体および枝条の核酸合成と蛋白質 (TCA-不溶成分) 合成を [5-³H] uridine と L-[4, 5-³H] leucine を用いて調べた (Figs. 2~6, Tables 5~7)。自発休眠から他発休眠にかけて、芽の原基体での ribosomal RNA (rRNA) と transfer RNA (tRNA) の明瞭な合成は認められない。しかし、tRNA より低分子の化合物合成は非常に増大した。また、この化合物は、poly A(-)type であった (Fig. 6)。一方、3月25日から5月25日にかけては、25S rRNA, 18S rRNA, 5S rRNA, 4S tRNA の合成が次第に盛んになった。

4) 自発休眠から他発休眠にかけて、蛋白質合成が認められた (Fig. 2, Table 5)。この蛋白質合成と自発休眠から他発休眠へかけての冬芽の耐凍性の増大とは密接な関連があると推定された。また、他発休眠から生長期の冬芽および枝条の RNA 合成および蛋白質合成と開芽・伸長との間には、明らかに関係があるが、詳細は不明で、今後の研究課題である。

引用文献

- 1) ASPART-PASCOT, L., DELSENY, M. and GUITTON, Y.: Occurrence of nucleoside polyphosphates in rapidly labelled RNA preparations from radish seedlings (*Raphanus sativus*). *Planta* **131**, 275-278 (1976).
- 2) 柴花 茂: トドマツ冬芽の耐凍性と開芽率の地域性. 日林北支講 **30**, 172-174 (1981).
- 3) 藤村好子・坂上幸雄: 鉢植トドマツ苗木の耐凍度の季節変化. 日林北支講 **31**, 94-95 (1982).
- 4) 後藤 健: トドマツの休眠に関する研究. 昭和52年度卒業論文.
- 5) HARRISON, M. A. and SAUNDERS, P. F.: The abscisic acid content of dormant birch buds. *Planta* **123**, 291-298 (1975).
- 6) 平沢輝茂: トドマツの休眠に関する研究. 昭和53年度卒業論文.
- 7) JARVIS, B. C.: The role of seed parts in the induction of dormancy of hazel (*Corylus avellana* L.). *New Phytol.* **75**, 491-494 (1975).
- 8) JARVIS, B. C. and SHANNON, P. R. M.: Changes in poly(A)RNA metabolism in relation to storage and dormancy-breaking of hazel seed. *New phytol.* **88**, 31-40 (1981).
- 9) LI, P. H. and WEISER, C. J.: Metabolism of nucleic acids in one-year old apple twig during cold hardening and de-hardening. *Plant & Cell Physiol.* **10**, 21-30 (1969).
- 10) LOENING, U. E.: The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* **102**, 251-257 (1967).
- 11) RICHTER, G. and GROTHA, R.: Schnell markierte, niedermolekulare Komponenten in Nucleinsäurepräparationen aus pflanzlichen zellen. *Planta* **116**, 273-278 (1974).
- 12) 匂坂勝之助: 植物越冬の生理・生化学. 化学と生物 **21**(5), 294-303 (1983).
- 13) 酒井 昭: 植物の耐凍性と寒冷適応—冬の生理・生態学—. 学会出版センター (1982).
- 14) 酒井 昭・吉田静夫: 植物と低温. 東京大学出版会 (1983).
- 15) SHIBAKUSA, R.: Growth inhibitors in leaves of *Abies sachalinensis* MASTERS in the dormant period (II). *J. Jap. For. Soc.* **55**, 91-94 (1973).
- 16) SHIBAKUSA, R.: Growth inhibitors in leaves of *Abies sachalinensis* MASTERS in the dormant period (III). *J. Jap. For. Soc.* **55**, 341-345 (1973).

- 17) 柴草良悦: トドマツおよびカラマツの生長と生長物質に関する研究. 北大演報 31, 293-378 (1974).
- 18) SHIBAKUSA, R.: Studies on the dormancy of *Abies sachalinensis* MASTERS (III) The change of growth substances in the dormant buds. J. Jap. For. Soc. 59, 400-404 (1977).
- 19) SHIBAKUSA, R.: Studies on the dormancy of *Abies sachalinensis* MASTERS (IV) Effects of growth substances on the growth of cultured embryonic shoots in the dormant period. J. Jap. For. Soc. 61, 47-52 (1979).
- 20) 柴草良悦・木俣聡彦: トドマツの休眠に関する研究 (I). 長日処理の秋伸び形成および初期休眠打破におよぼす影響. 日林誌 57, 224-227 (1975).
- 21) SHIBAKUSA, R. and KIMATA, M.: Studies on the dormancy of *Abies sachalinensis* MASTERS (II) Culture of the embryonic shoots in the dormant period. J. Jap. For. Soc. 58, 393-397 (1976).
- 22) SIMINOVITCH, D., BHEAUME, B., POMEROY, K. and LEPAGE, M.: Phospholipid, Protein and nucleic acid increases in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust tree cells. Cryobiology 5, 202-225 (1968).
- 23) TAKAIWA, F. and TANIFUJI, S.: Development of RNase activity in embryonic axes of germinating pea seeds. Plant & Cell Physiol. 19, 1507-1518 (1978).
- 24) 照本 勲: アカビートの耐凍性とフォスフォリラーゼ. 低温科学 B 15, 31-38 (1957).
- 25) 吉田静夫: 脂質からみた樹木の凍結障害—液胞膜での変化を中心として—. 化学と生物 12(12), 809-811 (1974).

Summary

In buds of *Abies sachalinensis* MASTERS in the innate dormancy (from the end of September to the end of November), and in the imposed dormancy (from the beginning of December to the end of April) and in shoots of the growing period (from the beginning of May to the beginning of July), the change of growth substances in collected embryonic shoots, the influence of growth substances on the growth of aseptically cultured embryonic shoots, and the synthesis of nucleic acids and proteins in collected embryonic shoots, were studied. The results were summarized as follows.

1) The change of growth substances in buds separated into embryonic shoots, bud scales and woody bud bases, and in shoots were investigated by *Avena* straight growth test.

There were a large amount of free growth inhibitors in bud scales and woody bud bases as well as in embryonic shoots in the dormant period (the innate dormancy and imposed dormancy), and they decreased gradually from the imposed dormancy to the growing period. The bound growth inhibitors of buds in the innate dormancy entirely disappeared in the beginning of March (Fig. 1-(1)~(5)). The most active substance in free growth inhibitors was thought to be abscisic acid (ABA).

2) The influence of Actinomycin D (Act. D) (the inhibitor of ribonucleic acid (RNA) synthesis), Cycloheximide (Ch) (the inhibitor of protein synthesis) and ABA on the growth of cultured embryonic shoots were investigated (Tables 1~4). Act. D had no influence on the growth of embryonic shoots from the innate dormancy to the beginning of the imposed dormancy, but 200 $\mu\text{g/ml}$ of Act. D inhibited them collected on March 20 in the end of the imposed dormancy. 10~100 $\mu\text{g/ml}$ of Ch inhibited them collected on all dates, and inhibited remarkably them collected on March 20. From these results, it seemed that the protein synthesis occurred in cultured embryonic shoots collected in the innate dormancy, and the

synthesis of RNA and protein occurred in cultured embryonic shoots collected in the end of the imposed dormancy. ABA inhibited the growth of embryonic shoots in the dormant period. ABA appeared to inhibit, at least, the protein synthesis judging from its similar action to Ch.

3) The synthesis of RNA and protein (trichloro acetic acid (TCA)-insoluble material) in embryonic shoots of buds and shoots were investigated by the radioactive precursors of [5-³H] uridine and L-[4,5-³H] leucine (Figs. 2~6, Tables 5~7).

From the innate dormancy to the imposed dormancy, the distinct synthesis of ribosomal RNA (rRNA) and transfer RNA (tRNA) were not recognized. The lower molecular weight compounds to be polyA(-)type than 4S tRNA (Fig. 6), increased remarkably from the innate dormancy to the imposed dormancy. The synthesis of 25S rRNA, 18S rRNA, 5S rRNA and 4S tRNA increased gradually from March 25 to May 25.

4) The protein synthesis were recognized in embryonic shoots from the innate dormancy to the imposed dormancy (Fig. 2, Table 5). The relationship between these protein synthesis and the increase of the freezing tolerance were presumed to be close. The relationship between the synthesis of RNA and protein from the imposed dormancy to the growth period and the active preparations of bud break or shoot elongation were clear, but they required further study.