

ニホンナシの芽の自発休眠機構並びに
低温要求性の遺伝様式に関する研究

The study on the mechanism of bud endodormancy and
hereditary pattern of chilling requirements in Japanese pear

竹 村 圭 弘

2 0 1 2

目次

緒論	1
第1章 ナシの芽の自発休眠打破に要する低温要求量	6
第1節 緒言	6
第2節 ニホンナシ品種における芽の自発休眠特性	7
第3節 自発休眠打破に要する低温要求量の地域間差異	11
第4節 ニホンナシ品種における低温要求量の品種間差異	14
第5節 野生種における低温要求量の差異	17
第6節 考察	21
第7節 摘要	23
第2章 ニホンナシの芽の自発休眠導入の気象要因とその機構	24
第1節 緒言	24
第2節 ハウス栽培が自発休眠の導入に及ぼす影響	26
第3節 長日および加温処理が自発休眠の導入ならびに ABA 含量に及ぼす影響	29
第4節 低温処理が自発休眠の導入に及ぼす影響	33
第5節 考察	37
第6節 摘要	40
第3章 ニホンナシの芽の自発休眠導入および打破に 関与する遺伝子の解析	41
第1節 緒言	41
第2節 自発休眠導入および打破に関与する候補遺伝子の単離	43
第3節 自発休眠期における候補遺伝子の発現量の変化 (発現解析 1)	48
第4節 導入期のニホンナシとタイワンナシの芽における 候補遺伝子の発現量の比較 (発現解析 2)	52
第5節 シアナミド処理による候補遺伝子の発現量の変化 (発現解析 3)	55
第6節 考察	58
第7節 摘要	61

第4章	ニホンナシの芽の自発休眠打破に關与するタンパク質の解析	62
第1節	緒言	62
第2節	自発休眠打破に關与するタンパク質の二次元電気泳動	64
第3節	MALDI-TOF-MSによる質量分析	70
第4節	nLC-ESI-MS/MSによる質量分析	75
第5節	考察	84
第6節	摘要	87
第5章	ニホンナシ系統 TH3 と少低温要求性タイワンナシ横山の F₁における自発休眠特性	88
第1節	緒言	88
第2節	台湾在来ナシ横山の自発休眠特性の調査および ニホンナシ系統TH3と横山のF ₁ 系統の育成	90
第3節	F ₁ 系統群の倍数性, 親子鑑定, S 遺伝子の判定および自発休眠特性の調査	92
第4節	F ₁ 系統群の落葉期および展葉期の調査	101
第5節	考察	104
第6節	摘要	108
第6章	総括	109
	総合考察	109
	要旨	116
	Summary	120
	謝辞	125
	引用文献	126
	本研究の基礎となる論文リスト	140

緒論

ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai) は中国揚子江流域原産の砂梨 (Sa-Li) を基に改良されたものであり、我が国をはじめ東アジアで栽培が行われてきた (菊池, 1948 ; 梶浦, 1983 ; Bell, 1991). 我が国においては、すでに 700 年代に栽培記録がある (梶浦, 2008 ; 田村, 2009) ことから、古来より重要な果樹の一つであったといえる. 近年では、ニホンナシが有する歯切れが良く (Crisp texture) 極めて多くの果汁を含む (梶浦, 1994 ; Rathore, 1991) といった特性が好まれ、ブラジル (Faoro, 2002) , オーストラリア, ニュージーランド (White, 2002) 等, アジア以外の諸地域でも本植物の栽培が盛んになっている (Bell, 1991 ; 中央果実基金, 1994) . しかしながら、栽培地域の拡大に伴い、生産地での栽培上の問題が多発しており、その代表例として、低緯度地域における芽の自発休眠打破に必要な低温量の不足があげられる (Westwood, 1978 ; Saure, 1985 ; Faoro, 2002).

ニホンナシをはじめとする落葉果樹は芽の自発休眠打破に低温要求量と呼ばれる一定時間の低温遭遇を必要とするが、その量は樹種あるいは品種に固有のものである (Westwood, 1978 ; Saure, 1985). 近年、地球温暖化により暖冬傾向にみまわれているが、自発休眠時の低温要求量が満たされない状態で春季を迎えた場合や加温栽培を行った場合には、厳しい発芽の遅延や生長途中で新梢や花器が枯死するなどの現象がみられる (Chandler ら, 1937). 実際に、ニュージーランドやブラジルでは低温要求量の不足による‘豊水’の発芽不良が報告されており (Kingston ら, 1990 ; Klinac・Geddes, 1995 ; Petri・Herter, 2002 ; Yamamoto ら, 2010) , 日本でも温暖化による落葉果樹の休眠問題が散見されている.

これらの対策としては、低温要求性の低い品種・系統の選抜や栽培技術の確立が求められる。これまでに、‘幸水’、‘豊水’、‘二十世紀’および‘新高’などの主要品種を含む多くのニホンナシ品種、チュウゴクナシおよびナシ属野生種などの低温要求量が明らかになっている (Tamura ら, 2001)。また、近年では食味が良好で病気に対する抵抗性を有する多くの新品種が育成されているが (梶浦・佐藤, 1990)、これらの新品種の果実品質や栽培上の注意点、収穫期などについては調査されているものの、低温要求量については調査されていないものが多い。今後、温暖化を考慮して栽培するためには栽培種および品種の低温要求量を把握したうえで気象条件の適当な地域において栽培することが必要不可欠となってくる。

また、低温積算量の不足を人為的に補う自発休眠打破剤についても研究が行われており、石灰窒素やシアナミド処理による休眠打破効果が確認されている (黒井ら, 1963 ; Iwasaki・Weaver, 1977 ; Shulman ら, 1983)。さらに、ニホンナシの自発休眠打破前に増加した芽の過酸化水素含量が、シアナミド処理後は減少したという報告もある (Kuroda ら, 2002)。これに加え、自発休眠打破時における呼吸量の変化 (Hatch・Walker, 1969) と、エチレン (Wang ら, 1985)、ジベレリン (Erez ら, 1979)、オーキシシン (Nakano ら, 1980)、サイトカイニン (Broom・Zimmerman ら, 1976 ; Sterrett・Hipkins, 1980) およびアブシジン酸 (ABA) (Corgan・Peyton, 1970 ; Emmweson・Powell, 1978 ; Seeley・Powell, 1981 ; 堀内ら, 1981 ; 田村ら, 1992, 1993 ; 望岡ら, 1996) 等、植物ホルモン含量の変化が自発休眠打破と深い関連性を示すことが示唆されている。

一方、これらの知見に比べて自発休眠導入に関する知見は限られており、導入に及ぼす気候条件については、日長であろうとする見解 (Kawase, 1961) と低温によるものとする報告 (東部ら, 1998) があるものの、ニホンナシの自発

休眠の導入条件については不明確である。現在、自発休眠打破期を予測するモデルとして、Chill unit モデルと（浅野・奥野，1990；Tamura ら，1997）DVI（Developmental Index：発育指数）モデルが（Sugiura・Honjo，1997）活用されているが、両モデルの低温積算開始日は、1日の積算値が正となった日から（浅野・奥野，1990；Tamura ら，1997）、あるいは暦日（Sugiura・Honjo，1997）である。今後、気候変動にともない自発休眠導入期の気候条件が不安定になり、導入期を的確に判断することが難しくなることも予想されるため、これらモデルの精度を維持するためには、ニホンナシが自発休眠に導入する気候要因を明確にすることが必要不可欠であるといえる。

また、導入および打破の機構解明を目的とした研究においては、近年、分子レベルでの研究も進んでいる。自発休眠に関与する遺伝子の解析事例の中では、MIKC-type dormancy-associated MADS-box（DAM）遺伝子が自発休眠の推移に関連する遺伝子として着目されており、モモ（*Prunus persica*）の DAM 遺伝子の発現量は、自発休眠最深期から打破期にかけて低下すると報告されている（Bielenberg ら，2004，2008；Jimenez ら，2009）。類似した結果はニホンナシでも示されているが（Ubi ら，2010）、自発休眠の導入や打破の詳しい機構についてはやはり不明な点が多い。

一方、実際に発現しているタンパク質を解析した研究は少ないが、Tamura ら（1998）は秋季から冬季におけるニホンナシの花芽中のタンパク質を二次元電気泳動により分離し比較した結果、19 kDa のタンパク質は11月下旬から12月上旬にかけて消失し、同時にやや塩基性側に同一分子量のタンパク質を検出している。現在、このタンパク質の同定には至っていないが、近年では多数のタンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析も進んでいるため、このようなタンパク質を解析することで、自発休眠打破の機構解明に繋がると期待される。

このような機構解明を目的とした研究に加え、急務とされているのは、低温要求量の少ない新たなニホンナシ品種の育成である。ニホンナシの主要品種の中で最も低温要求量が少ないとされている‘豊水’は、低温要求量 (Chill unit : CU) CU. 800 であるため、これより少ない低温要求量の品種を育成するためには、これまでに用いられていない新たな育種素材が必要とされる。そして、その候補として期待されるのは熱帯地域の台湾に在来するナシである横山である。横山は自発休眠に導入せず、自発休眠打破に必要な低温要求量を保有していたとしても、その量は著しく少ないと考えられる。そこで、横山を花粉親、‘おさ二十世紀’の自殖により育成され自家和合性遺伝子 S_4^{sm} をホモでもつと考えられるニホンナシ系統 TH3 を種子親として、現在はその F₁ 系統群を少低温要求性ニホンナシ品種の作出のために育成している。これら F₁ 系統群が少低温要求性ニホンナシ品種を育成するための中間母本になるのか否かを判断するためには、横山の有する少低温要求性の形質が F₁ 系統群にどのように遺伝するかを明確にしておく必要がある。

以上のように、低温積算量の不足が懸念される地域において、今後より安定したニホンナシの栽培が行われるためには、自発休眠機構の解明と新たな少低温要求性ニホンナシ品種の育成は必須の条件である。そこで本研究では、第 1 章として、実際に発芽不良が報告されている地域におけるニホンナシの自発休眠の推移について調査を行い、現在栽培されている品種の打破時期を確認した。そのうえで、これまでに調査されていないニホンナシ品種およびナシ属野生種の自発休眠打破に必要な低温要求量を明確にした。また、第 2 章では、ニホンナシが自発休眠に導入する気候要因として、日長、気温または両方の関与を明らかにし、休眠導入に有効な温度域についても調査を行った。さらに、第 3 章では自発休眠機構の解明を目的とし、導入および打破時に特異的に発現してい

る遺伝子の単離と発現解析を行った。第 4 章では、実際に自発休眠最深期と打破期で発現しているタンパク質を同定し、単離された遺伝子との関連性を基に、自発休眠打破期の芽における生理的变化から休眠機構の解明に迫った。そして、第 5 章では、少低温要求性ニホンナシ品種の育成にあたり、ニホンナシ系統 TH3 とタイワンナシ横山の F₁ 系統の休眠特性について調査を行い、少低温要求性品種の中間母本としての利用可能性についても検討した。

第1章 ナシの芽の自発休眠打破に要する 低温要求量

第1節 緒言

現在、ニホンナシの自発休眠打破期を予測するモデルとして、Chill unit モデルと（浅野・奥野，1990；Tamura ら，1997）DVI モデルが（Sugiura・Honjo，1997）活用されている。ニホンナシの自発休眠打破に必要な低温要求量は、品種ごとに異なっており（浅野・奥野，1990；Tamura ら，1995，2001），Tamura ら（2001）は低温要求量を Chill unit として評価したところ，その多少には 800–1800 のレンジがあることを確認している。

近年では食味が良好で病気に対する抵抗性を有する多くの新品種が育成されているが（梶浦・佐藤，1990），これらの新品種の果実品質や栽培上の注意点，収穫期などについては調査されているものの，低温要求量については調査されていないものが多い。今後，温暖化を考慮して栽培するためには栽培種および品種の低温要求量を把握したうえで気象条件の適当な地域において栽培することが必要不可欠となってくる。

本研究では、近年育成された新品種に加え，これまでに低温要求量が調査されていない品種や野生種の低温要求量を決定するため，萌芽率の季節的変化を調査した。さらに，花芽と葉芽の自発休眠の推移の違いについても検討し，日本の異なった地域におけるニホンナシの自発休眠の推移についても調査を行った。

第2節 ニホンナシ品種における芽の自発休眠特性

ニホンナシをはじめとする落葉果樹は樹種あるいは品種によって固有の低温要求量をもち、それが満たされることで芽の自発休眠は打破される (Westwood, 1978 ; Saure, 1985). また、同じ品種内でも芽の種類の違いによって低温要求量が異なっていることが、いくつかの樹種で報告されている (久保田・楠原, 1997 ; Gariglioら, 2006 ; Chavarria ら, 2009). Tamura ら (1995) は、ニホンナシ ‘二十世紀’ の葉芽と腋花芽の萌芽率を比較し、葉芽に比べ腋花芽の自発休眠の深度が浅いことを示している. しかしながら、他の主要品種についての知見はみられず、この点を明確にすることは、品種ごとの低温要求量を評価するためには不可欠である.

本節では、ニホンナシの低温要求量が芽の種類によってどのように異なるかを検討するため、経時的に腋花芽および葉芽を採取し、萌芽率の調査を行った.

材料および方法

鳥取大学農学部附属農場に栽植されているニホンナシ品種 ‘豊水’, ‘幸水’, ‘ゴールド二十世紀’ および ‘新高’ を供試した. 2008 年 11 月下旬から 2009 年 1 月下旬にかけて腋花芽および葉芽がそれぞれ連続して着生している発育枝を採取した. 落葉以前の発育枝は摘葉した後、頂芽を切除して芽が 7 節着生した枝をそれぞれ 5 本調製した. その後、0.03%硫酸アルミニウムおよび 0.3% 8-ヒドロキシキノリンを添加した水溶液中においた吸水性スポンジに水挿しした. 水挿し後は、 $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の照明下の恒温室内に静置し、水挿し後 28 日目の萌芽率を調査した. 腐敗防止のため 7 日ごとに水替えを行い、同時に水切りによって正常な部分まで切り戻しを行った. 花芽および葉芽の発

育程度を第 1.1 図と第 1.2 図にそれぞれ示すように 7 段階に分けて記録した。本実験では発育段階 3 以上に達した芽を萌芽したとみなし、上位 5 節の萌芽の有無から 5 本の平均値を萌芽率として算出した。また、Chill Unit (CU) の算出には Tamura ら (1997) が作成した温度係数を用いた。



第 1.1 図 花芽の発育段階



第 1.2 図 葉芽の発育段階

結果

‘豊水’の葉芽の萌芽率は11月下旬の時点で8%であった(第1.1表)。その後、12月中旬から1月上旬まで0%で推移し1月中旬には72%に上昇した。一方、花芽の萌芽率は全調査日とも50%以上と葉芽に比べて高く、1月上旬には100%に達した。‘幸水’の葉芽は‘豊水’の葉芽とほぼ同様の推移を示し、1月中旬には72%に上昇した。また、11月下旬の時点での‘幸水’の花芽の萌芽率は52%と葉芽に比べて高かった。その後、12月中旬には0%に低下し、1月中旬には100%に達した。‘ゴールド二十世紀’の花芽と葉芽の萌芽率は、ほぼ同じ値で推移したが、全調査日において花芽の方が高かった。‘新高’の葉芽の萌芽率は、12月中旬から1月上旬まで0%であったが、同時期における花芽の萌芽率は60, 24, 24%と推移した。

第 1.1 表 花芽と葉芽の萌芽率の比較

品種	採取日 (月/日) (CU ^y)	萌芽率 (%) ^z					
		11/26 (237)	12/15 (541)	12/25 (702)	1/5 (922)	1/15 (1159)	1/27 (1438)
豊水	葉芽	8 b ^x	0 b	0 b	0 b	72 a	
	花芽	88 ab	52 b	72 b	100 a	100 a	
幸水	葉芽	8 b	4 b	8 b	0 b	72 a	
	花芽	52 b	0 d	20 c	24 bc	100 a	
ゴールド二十世紀	葉芽	36 b	0 c	8 c	12 bc	-	72 a
	花芽	48 b	0 d	20 c	24 bc	-	100 a
新高	葉芽	-	0 b	0 b	0 b	-	68 a
	花芽	-	60 b	24 c	24 c	-	100 a

^z23°C で水挿し加温処理し 28 日後に調査

^y10 月 31 日を積算開始日とした CU

^x同列内の異なる英文字は χ^2 検定において 5%水準で有意差あり

第3節 自発休眠打破に要する低温要求量の地域間差異

前節の結果から、葉芽は花芽に比べて自発休眠の深度が深く、自発休眠打破に必要な低温要求量も花芽に比べて多いと考えられた。そのため、葉芽の萌芽率を調査することで、それぞれの品種の自発休眠打破に十分な低温要求量を評価することが可能であると考えられた。すなわち、低温要求量が不十分であると開花には至るものの、正常な枝葉の成長が得られず、次年度以降の花芽が確保できないことになるからである。

近年、ニホンナシの栽培エリアは拡大しており、南北アメリカ大陸、オセアニアなど海外の諸地域においても栽培が盛んになっている (Bell, 1991)。しかしながら、ニュージーランドやブラジルでは低温積算量の不足による、春季の発芽不良が発生している (Kingston ら, 1990 ; Klinac・Geddes, 1995 ; Petri・Herter, 2002 ; Petri ら, 2002)。日本でも温暖化による落葉果樹の休眠問題が散見されており、特に九州地区を中心に同様の発育不良が報告されている (黒田, 2004)。今後は、各地域の気象に適応しうる低温要求量をもつ品種を栽培していくことが必要になると考えられる。

本節では、そのための基礎的知見を得るため、経緯度の異なる地域において低温要求量の異なる 2 品種の自発休眠打破期を観察し、低温不足の実態について調査を行った。

材料および方法

鳥取大学農学部附属大塚農場（鳥取：35.5°N, 134.2°E），佐賀県果樹試験場（佐賀：33.3°N, 130.2°E），熊本県農業研究センター（熊本：32.6°N, 130.7°E）に栽植されているニホンナシを供試材料とした。全3地域とも‘豊水’および‘新高’を調査品種とし，2009年11月上旬から2010年2月中旬にかけて定期的に1年枝を採取した。採取した枝は前節と同様の方法で葉芽を観察し，萌芽率およびCUを算出した。

結果

鳥取における‘豊水’の萌芽率は11月下旬から1月上旬まで20%以下の値で推移し，その後，1月中旬には80%に上昇した（第1.2表）。一方，1月中旬における‘新高’の萌芽率は44%であり，2月上旬には88%に上昇した。佐賀における‘豊水’の萌芽率は，同時期における鳥取の‘豊水’に比べ低かったものの1月中旬には60%に達した。一方，佐賀で‘新高’の萌芽率が60%以上に達したのは2月中旬であった。熊本における両品種の萌芽率は，11月上旬から1月上旬まで20%以下であった。その後は両品種とも1月中旬に24%に上昇し，2月中旬には100%に達した。

また，2月15日の鳥取，佐賀，熊本のCUはそれぞれ，1909，1745，1566であった。

第 1.2 表 3 地域における‘豊水’および‘新高’の葉芽の萌芽率の推移

調査地域 (経緯度)	品種	採取日 (月/日)	萌芽率 (%) ^z							
			11 / 10	11 / 24	12 / 8	12 / 22	1 / 6	1 / 18	2 / 2	2 / 15
鳥取 (35.5°N, 134.2°E)		(CU) ^y	(0)	(190)	(391)	(654)	(994)	(1298)	(1597)	(1909)
	豊水		28 b ^x	12 bc	16 bc	4 c	8 c	80 a	—	—
	新高		12 c	0 c	8 c	24 bc	28 bc	44 b	88 a	—
佐賀 (33.3°N, 130.2°E)		(CU)	(0)	(178)	(350)	(578)	(928)	(1226)	(1503)	(1745)
	豊水		0 c	20 b	0 c	0 c	28 b	60 a	—	—
	新高		4 c	4 c	0 c	0 c	4 c	32 b	44 b	84 a
熊本 (32.6°N, 130.7°E)		(CU)	(0)	(168)	(297)	(534)	(833)	(1122)	(1361)	(1566)
	豊水		20 b	16 bc	12 bc	0 c	16 bc	24 b	32 b	100 a
	新高		12 bc	16 bc	0 c	—	20 b	24 b	40 b	100 a

^z23°C で水挿し加温処理し 28 日後に調査

^y10 月 31 日を積算開始日とした CU

^x同列内の異なる英文字は χ^2 検定において 5%水準で有意差あり

第4節 ニホンナシ品種における低温要求量の品種間差異

前節の結果から、経緯度の異なる地域では同時期における CU の積算値が異なり、同じ品種であっても自発休眠打破期が異なることが明らかであった。CU の値が積算しにくい地域でニホンナシを栽培するためには、低温要求量の少ない品種を選択する必要がある。近年、食味が良好で自家和合性を示す多くのニホンナシが新品種として登録されている（田辺ら、2001）。しかしながら、品種登録には低温要求量を調査する必要はなく、多くの新品種については低温要求量が不明なままである。

これまでに、Tamura ら（2001）は‘幸水’、‘豊水’、‘二十世紀’および‘新高’などの主要品種に加え、多くのニホンナシの低温要求量を評価している。その結果から、最も低温要求量の少ない品種では CU. 800 程度であり、多い品種では CU. 1800 とそれぞれの品種間で低温要求量の違いが大きいことを示している。本節では、近年に品種登録された新品種に加え、これまでに低温要求量が評価されていない品種の自発休眠の推移について調査を行った。

材料および方法

鳥取大学農学部附属大塚農場および鳥取県園芸試験場に栽植されている 17 品種（第 1.3 表）を供試材料とした。全品種とも、2008 年 10 月中旬から 2009 年 2 月下旬にかけて定期的に 1 年枝を採取した。採取した枝は前節と同様の方法で葉芽を観察し、萌芽率および CU を算出した。

結果

全品種とも、11 月中旬から 12 月中旬の萌芽率が最も低かった（第 1.3 表）。その後、全品種の萌芽率は 1 月上旬から 2 月上旬の間に最も高い値を示した。‘あきづき’、‘夏そよか’、‘涼月’ および ‘新甘泉’ の萌芽率は、1 月上旬に 70% 以上に達した。調査品種の中で最も遅くに萌芽率が 70% 以上に達したのは ‘秀玉’ であった。

第 1.3 表 調査品種の葉芽の萌芽率の推移

品種 (Origin, species, parent)	採取日 (CU ^y)	萌芽率 (%) ^z										
		10/15	10/31 (0)	11/18 (91)	12/3 (408)	12/16 (586)	12/26 (778)	1/7 (1054)	1/16 (1267)	1/26 (1504)	2/6 (1741)	
あきづき (162-29×幸水)	—	28 b	0 c	0 c	4 c	24 bc	88 a					
秋甘泉 (おさ二十世紀×豊水)	32 bc	20 c	0 d	0 d	0 d	28 bc	60 b	100 a				
夏そよか (おさ二十世紀×秀玉)	24 c	4 cd	12 cd	4 cd	0 d	8 cd	72 ab					
涼月 (おさ二十世紀×鳥幸)	56 b	16 c	12 c	0 c	8 c	44 bc	92 a					
えみり (八里×おさ二十世紀)	36 bc	8 c	16 c	0 c	0 c	40 bc	52 b	88 a				
夏さやか (八雲×おさ二十世紀)	56 b	4 cd	24 bc	4 cd	0 d	16 c	52 b	72 ab	92 a			
なつひめ (筑水×おさ二十世紀)	44 bc	16 c	20 c	4 cd	0 d	48 bc	68 b	96 a				
新甘泉 (筑水×おさ二十世紀)	36 b	4 c	12 bc	16 bc	4 c	36 b	88 a					
なつしずく (平塚 No.25×筑水)	—	—	—	—	4 c	44 b	64 b	100 a				
王秋 (C-2×新雪)	24 c	0 d	0 d	0 d	0 d	4 cd	24 c	28 c	68 b	100 a		
品種 (Origin, species, parent)	採取日 (CU)	10/17	11/4 (0)	11/19 (83)	12/1 (392)	12/15 (560)	12/26 (744)	1/7 (1018)	1/16 (1231)	1/26 (1462)	2/6 (1660)	2/24 (2010)
ピンゴリー (<i>P. bretschneideri</i> Rehder)	24 bc	0 c	0 c	0 c	12 c	4 c	36 bc	52 b	48 b	88 a		
独逸 (神奈川県)	—	—	0 c	0 c	0 c	0 c	16 bc	44 b	32 b	84 a		
類産梨 (新潟県)	20 b	16 bc	0 c	4 bc	12 bc	12 bc	12 bc	92 a				
にっこり (新高×豊水)	16 bc	12 bc	0 c	4 c	8 c	12 bc	16 bc	36 bc	40 b	84 a		
新星 (翠星×新興)	32 c	16 cd	0 d	0 d	0 d	—	32 c	68 b	—	100 a		
翠星 (菊水×八雲)	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c	—	40 b	84 a		
秀玉 (菊水×幸水)	28 bc	24 bc	4 c	4 c	0 c	0 c	24 bc	0 c	48 b	32 b	100 a	

^z23°C で水挿し加温処理し 28 日後に調査

^y10 月 31 日を積算開始日とした CU

^x 同列内の異なる英文字は χ^2 検定において 5%水準で有意差あり

第5節 野生種における低温要求量の差異

前節の結果から、低温要求量の少ない品種は CU. 1000, 多い品種では CU. 2000 と個々の品種間で低温要求量の違いが大きいことが明らかとなった。これまでに、Tamura ら (2001) はチュウゴクナシやニホンナシ品種に加え、野生種についても低温要求量の評価を行っている。その中には、品種登録されているナシよりも低温要求量の少ない種や系統が確認されている。近年の研究からは、低温要求量を決める遺伝要因が量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus : QTL) であると考えられているため (van Dyk ら, 2010 ; Campoy ら, 2011) , そのような種や系統は低温要求量の少ない品種を育成するための育種素材としても期待される。本節では、これまでに低温要求量が評価されていない野生種や系統についても萌芽率の調査を行い、低温要求量の評価を行った。

材料および方法

鳥取大学農学部附属大塚農場に栽植されている 16 種 (第 1.4 表) を供試材料とした。2009 年 11 月上旬から 2010 年 2 月上旬にかけて定期的に 1 年枝を採取した。採取した枝は前節と同様の方法で葉芽を観察し、萌芽率および CU を算出した。

結果

調査を行った野生種および系統のうち10種の萌芽率は、1月上旬の時点で70%以上に達した（第1.4表）。そのうち、*P. calleryana* (No. 12) の萌芽率は調査期間内で常に30%以上の値を示した。*P. amygdaliformis*, *P. communis*, *P. elaeagrifolia* および *P. lindleyi* の4種の萌芽率が60%以上に達したのは2月上旬であった。さらに、*P. dimorphophylla* (No. 5), *P. michauxii* は2月上旬の時点でも萌芽率が60%以下であった。

第 1.4 表 野生種および各系統の葉芽の萌芽率の推移

種および系統名 (系統番号, 系統名)	採取日 (CU ^y)	萌芽率 (%) ^z					
		11 / 8	12 / 6	12 / 22	1 / 7	1 / 21	2 / 4
		(35)	(363)	(674)	(1048)	(1384)	(1717)
<i>P. amygdaliformis</i>		24 b	48 ab	0 c	56 a	40 ab	68 a
<i>P. betulaeifolia</i>		24 b	40 b	20 b	92 a		
<i>P. calleryana</i> (No.12)		36 b	48 b	44 b	88 a		
<i>P. communis</i>		20 b	28 b	0 c	28 b	12 bc	68 a
<i>P. dimorphophylla</i> (No.4)		20 b	16 b	12 b	100 a		
<i>P. dimorphophylla</i> (No.5)		12 b	20 b	12 b	48 ab	48 ab	52 a
<i>P. dimorphophylla</i> (No.6)		32 b	80 a	28 b	72 a		
<i>P. elaeagrifolia</i>		72 a	32 b	16 b	48 ab	28 b	60 ab
<i>P. fascicularis</i>		68 a	80 a	16 b	88 a		
<i>P. hondoensis</i> (アオナシ)		56 b	76 ab	28 b	88 a		
<i>P. lindleyi</i>		20 bc	28 b	0 c	56 ab	24 b	80 a
<i>P. michauxii</i>		16 ab	40 a	8 b	8 b	28 ab	24 ab
<i>P. pyrifolia</i> (サワイリヤマナシ)		20 b	24 b	0 c	76 a		
<i>P. serotina</i>		40 b	76 a	16 b	88 a		
<i>P. uyematsuana</i> (アイナシ)		0 c	44 b	12 c	96 a		
<i>P. yohrohensis</i> (養老ナシ)		32 b	44 b	8 c	100 a		

^z23°C で水挿し加温処理し 28 日後に調査

^y10 月 31 日を積算開始日とした CU

^x同列内の異なる英文字は χ^2 検定において 5%水準で有意差あり

第 1.5 表 野生種および各品種の低温要求量

低温要求量 (CU)	種および品種名
400-800	* <i>P. fauriei</i>
800-1000	<i>P. betulaeifolia</i> , <i>P. calleryana</i> (No.12), <i>P. dimorphophylla</i> (No.4, 6), <i>P. fascicularis</i> , <i>P. hondoensis</i> (アオナシ), <i>P. pyrifolia</i> (サワイリヤマナシ), <i>P. serotina</i> , <i>P. uyematsuana</i> (アイナシ), <i>P. yohrohensis</i> (養老ナシ), *Ci Li, あきづき, *豊水, 夏そよか, *二宮, 涼月, 新甘泉
1000-1200	*Qui Bai Li, *ヤーリー, 秋甘泉, *長十郎, えみり, *幸水, なつひめ, 夏さやか, 夏しずく, 類産梨, *早生幸蔵
1200-1400	ゴールド二十世紀, *八幸, 新高, *二十世紀, *太白, *八雲
1400-1600	<i>P. lindleyi</i> , * <i>P. longipes</i> , Ping Gou Li, *長寿, 独逸, *八達, *今村秋, *菊水, *雲井, にっこり, 新星, *新雪, 翠星
1600-1800	<i>P. amygdaliformis</i> , * <i>P. aromatic</i> , * <i>P. communis</i> , <i>P. dimorphophylla</i> (No.5), <i>P. elaeagrifolia</i> , *Bai Li, *Bei Jing Bai Li, *赤穂, *天の川, *君塚早生, *晩三吉, 王秋, *新雪, *新水
1800 <	<i>P. michauxii</i> , 秀玉

* は Tamura (2001) を引用

第6節 考察

近年、自発休眠打破に必要な低温積算量の不足による春季の発芽不良が懸念されており、地域ごとに適した低温要求量の品種を栽培していくことが重要である。さまざまな品種や系統の低温要求量を調査するための基礎的知見を得るため、まず4品種のニホンナシを用い花芽と葉芽の自発休眠の推移を比較した。

‘豊水’および‘幸水’の葉芽は調査開始日の11月26日の時点で、すでに自発休眠に導入していた。一方、同時期における両品種の花芽の萌芽率は葉芽に比べて高く、自発休眠導入期は花芽の方が遅かったが、打破期は葉芽に比べて早かった。これまでの研究からも、‘二十世紀’の葉芽は腋花芽に比べて多くの低温要求量が必要であると報告されている(Tamuraら, 1995)。葉芽の自発休眠の深度は花芽に比べて深く、自発休眠打破に必要な低温要求量も花芽に比べて多いと考えられたため、葉芽の萌芽率を調査することで自発休眠打破に十分な低温要求量を評価することが可能であると考えられた。

この結果を踏まえ、実際に発芽不良が散見されている九州の2県について葉芽の自発休眠の推移を鳥取県と比較した。鳥取での‘豊水’の打破期は1月中旬、‘新高’は2月上旬であった。一方、佐賀における‘豊水’の自発休眠打破期は鳥取とほぼ同じ時期であったものの、‘新高’の打破期は鳥取より約1ヵ月遅い2月中旬であった。熊本における‘豊水’の打破期も鳥取より約1ヵ月遅く、‘新高’の打破期は佐賀とほぼ同じ時期であった。CUの積算値に着目すると、鳥取で‘豊水’が休眠打破した1月18日の時点で、鳥取でのCUは1298、佐賀は1226、熊本は1122であり、CUの積算が遅い地域は自発休眠の打破期も遅いという結果になった。また、2月15日の時点でも熊本のCUは1566であった。熊本地方の気象の数値をみると、2月上旬以降は急速に気温が上昇するため、

熊本では CU. 1500 以上の低温要求量を必要とする品種の栽培は困難であると考えられた。

以上のように、経緯度の異なる地域では低温積算の推移が異なるため、各地域に適した低温要求量のニホンナシを選び栽培する必要があるため、Tamura ら (2001) は多くのニホンナシについて低温要求量の評価を行っているが、近年、品種登録された新品種については調査が行われていない。本研究で新たに調査したニホンナシ品種の中では‘あきづき’、‘夏そよか’、‘涼月’および‘新甘泉’の4品種のCUが約1000で最も低かった(第1.5表)。一方、最も多かったのは‘秀玉’のCU約2000であり、品種間で大きなCUの差がみられた。近年、数種の落葉果樹において低温要求量に関与するQTLが確認されており、アンズ (*Prunus armeniaca* L.) では第5染色体上に (Campoy ら, 2011)、リンゴ (*Malus domestica* Borkh) では第9染色体上に (van Dyk ら, 2010) QTL が存在すると考えられている。さらに、リンゴでは低温量の少ない‘Anna’を育種素材とした少低温要求性品種の育成が行われている (van Dyk ら, 2010)。また、ナシ属とリンゴ属のゲノム配列には高い相同性がみられるため、低温要求量の少ないナシは少低温要求性ニホンナシ品種を育成するための育種素材としても期待される。

本研究で調査を行った野生種および系統のうち10種の低温要求量は、CU. 800-1000であった。さらに、*P. calleryana* (No. 12) の萌芽率は調査期間内で常に30%以上の値を示した。*P. calleryana* は台木として広く利用されており、その中の系統 No. 6 と No. 8 は耐水性が強いことも知られている (Tamura ら, 1996)。Westwood・Chestnut (1964) は低温積算が不十分な状態の‘Bartlett’を低温要求量の多い *P. communis* と少ない *P. calleryana* に接ぎ木し自発休眠打破に及ぼす台木の役割を調査した結果から、台木に少低温要求性系統を用いることで穂木の自

発休眠打破を促進させる効果があると報告している。そのため、*P. calleryana* (No. 12) は低温積算量が蓄積しにくい地域における少低温要求性台木として期待される。

第7節 摘要

ニホンナシ品種およびナシ属野生種の萌芽率を調査し、自発休眠打破に必要な低温要求量を明らかにした。‘豊水’、‘幸水’、‘ゴールド二十世紀’および‘新高’の葉芽は、花芽に比べ低温要求量が多かった。3地域における‘豊水’と‘新高’の自発休眠は、低温積算量の蓄積の早さに伴い、鳥取、佐賀、熊本の順で打破した。熊本における両品種の打破期である2月中旬の低温積算量は1566であった。この結果から、熊本においてはCU. 1500以下の低温要求量を有する品種を選択する必要があると示唆された。調査を行ったニホンナシ品種の中では、‘あきづき’、‘夏そよか’、‘涼月’および‘新甘泉’の低温要求量が最も少なかった。一方、最も多かったのは‘秀玉’であり、ニホンナシ品種の低温要求量には、800–1800のレンジが確認された。調査を行ったナシ属野生種のうち14種は、1月7日から2月4日の間に萌芽率が60%に達した。その中の*P. calleryana* (No. 12) は低温要求量が最も少なく、低温積算量が蓄積しにくい地域における少低温要求性台木として期待された。

第2章 ニホンナシの芽の自発休眠導入の 気象要因とその機構

第1節 緒言

前章の結果から、ナシの自発休眠打破に必要な低温要求量には系統および品種間で大きな差があることが明らかとなった。前章で使用した Chill unit モデル (Tamura ら, 1997) と、休眠打破期と開花期の予測に活用されている DVI モデル (Sugiura・Honjo, 1997) の低温積算開始日は、1日の積算値が正となった日から (浅野・奥野, 1990 ; Tamura ら, 1997), あるいは暦日 (Sugiura・Honjo, 1997) とそれぞれ設定されているが、いずれも基本的には休眠導入された時点から積算を開始しているといえる。落葉果樹の自発休眠導入に関する知見は限られており (Dennis, 1994), わずかに日長であろうとする見解 (Kawase, 1961) と低温によるものとする報告 (東部ら, 1998) がある。また、ブドウを用いた研究 (During・Alleweldt, 1973) では、休眠開始期から中期に枝梢中に蓄積されるアブシジン酸 (ABA) が休眠の導入および深度と関連があると指摘されている。ニホンナシに関して Gemma (1995) は、‘幸水’の自発休眠の打破が前年露地栽培した樹に比べ、前年加温ハウス栽培した樹で早いことを指摘していることから、枝あるいは芽の生理的な齢も休眠の導入に関与するものと考えられる。さらに Tamura ら (1997) は、自発休眠導入期が栽培年によって約 10 日程度異なると報告している。一方、近年は秋季の気温が高く、以前に比べニホンナシの落葉期が遅くなる傾向がみられる。しかしながら、この点と自発休眠導入との関連性については不明確である。従って、現在使用されているモデルの

精度を今後も維持していくためには、低温積算の起算条件すなわち自発休眠導入の要因を明かにすることが必要不可欠である。

以上の点を踏まえて、本章ではニホンナシの自発休眠導入の誘導要因と機構を解明するために、ハウス栽培、日長ならびに低温がニホンナシの自発休眠導入に及ぼす影響について調査を行った。さらに、ニホンナシの自発休眠導入とABAとの関係についても検討を行った。

第2節 ハウス栽培が自発休眠の導入に及ぼす影響

前章の結果から、ナシの自発休眠打破に必要な低温要求量には系統および品種間で大きな差があることが明らかとなった。このような自発休眠打破に関する研究に比べ、休眠導入に関する知見は少ない。その中で、ニホンナシに関して Tamura ら (1997) は自発休眠導入期が栽培年によって約 10 日程度異なるという報告をしている。また Gemma (1995) は、‘幸水’の自発休眠の打破が前年に露地栽培した樹に比べ、前年加温ハウス栽培した樹で早いことを指摘していることから、枝あるいは芽の生理的な齢も休眠の導入に関与するものと考えられる。

本節では、ニホンナシの自発休眠導入の要因を解明するため、ハウス栽培区と露地栽培区における自発休眠の推移について調査を行った。

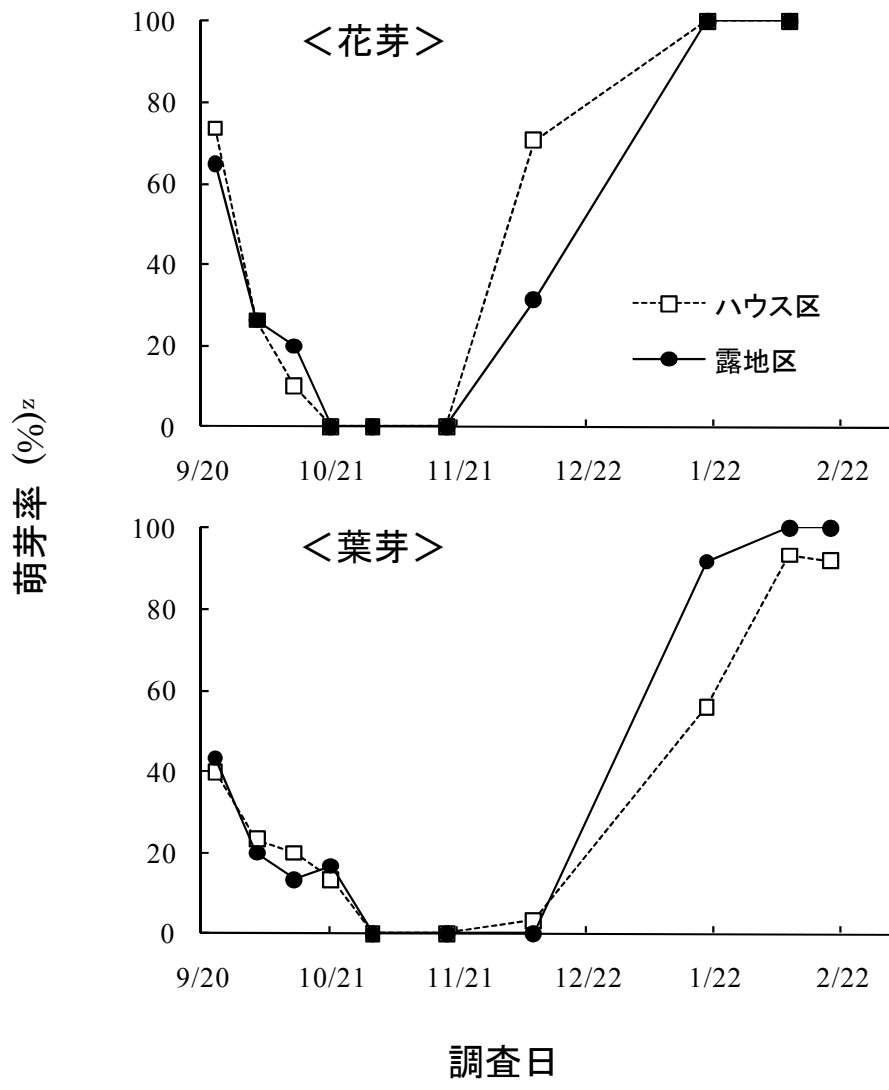
材料および方法

実験は 2004 年の春より、鳥取県農林総合研究所園芸試験場の露地圃場およびハウスに栽植されている‘ゴールド二十世紀’成木（高接ぎ樹：接ぎ木後 17 年，中間台‘二十世紀’33 年生）各 5 樹を用いて行った。

自発休眠の深度を調査するため、導入期である 9 月中旬～10 月下旬までは 10 日間隔で、その後は 11 月 18 日，12 月 9 日，1 月 20 日，2 月 9 日および 2 月 18 日に枝を採取した。各区より短果枝および 10 節程度の発育枝を採取し，採取した枝は前章と同様の方法で花芽および葉芽を観察した。

結果

ハウス区，露地区ともに，花芽および葉芽の萌芽率は9月下旬以降に低下し，花芽は10月21日に，葉芽は10月31日に萌芽率が0%に達した．この間，両区の萌芽率に差異はみられなかった．両区とも，花芽は11月18日以降に，葉芽は12月9日以降に萌芽率が上昇し始めた．その後，花芽はハウス区で，葉芽は露地区で萌芽率の上昇がやや早く進行する傾向がみられた（第2.1図）．



第 2.1 図 ハウス栽培がニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の芽の自発休眠の推移に及ぼす影響

^z 23°C で水挿し加温処理 28 日後に調査

* Student の t 検定により「ハウス区」と「露地区」間において 5% 水準で有意差あり

第3節 長日および加温処理が自発休眠の導入ならびに ABA 含量に及ぼす影響

前節の結果より、花芽分化の完了から自発休眠期までの経過時間が長いハウス栽培樹と、経過時間が短い露地栽培樹の自発休眠導入期には明確な差がみられなかった。このため、芽の自発休眠導入には秋季の気象要因が関与していると推測される。ブドウを用いた研究では、‘デラウェア’の芽に長日処理を行ったところ、自然条件下に比べ自発休眠導入がやや遅くなったと報告されている(堀内ら, 1981)。そのうえで堀内ら(1981)は、ブドウの芽の自発休眠導入を促す要因は日長条件よりも気温の低下と密接に関連があるとしている。一方、植物ホルモン含量の変化に着目した研究では、休眠開始期から中期のブドウの枝梢中に蓄積される ABA が休眠導入へ関連していると指摘されている(During・Alleweldt, 1973)。

本節では、ニホンナシの自発休眠導入への気候的要因を調査するため、長日および加温処理を行い、露地区との自発休眠導入期の比較を行った。また、各処理区における芽の ABA 含量を測定し、自発休眠導入との関連性についても調査を行った。

材料および方法

実験には鳥取大学農学部で育成し、9 L 容の駄温鉢に植栽した‘ゴールド二十世紀’樹（3 年生）を用いた。2004 年 9 月 1 日から全 28 個体のうち半数の 14 個体に長日処理を施し、他の半数は自然日長下で栽培した。さらに、10 月 15 日から加温処理を行うため、各日長処理区からそれぞれ半数の 7 個体を最低気温 18°C に設定したガラス温室内に移動し、他の半数は露地で栽培した。また、温室、露地ともに移動後も日長処理は継続した。

長日処理は照度 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の電照を用いて行い、16 時間日長とするため日の出前および日の入り後に補光を行った。日長および加温処理は、ともに調査が終了する 12 月 10 日まで継続した。これら計 4 処理区より 10 月 24 日および 12 月 10 日の計 2 回、1 年生枝を採取した。採取した枝は頂芽を切除し、落葉していなかった葉は摘葉後、葉芽 5 芽が着生している状態で 5 節ずつに切り分けた。5 本の枝について、前節と同様の方法で葉芽の萌芽率を調査した。

葉芽中の ABA 含量を測定するため、日長処理直前の 9 月 1 日、加温処理前の 10 月 14 日と処理中の 11 月 12 日に、各処理区より葉芽 1 g を採取した。試料は採取後ただちに液体窒素で凍結させた後、80%メタノールで抽出し、溶媒による分画化と C18 カラムによって精製した。さらに、精製試料を HPLC によって分画した。HPLC の条件は、移動相：アセトニトリル/水 = 20/80~70/30 の濃度勾配、カラム：SISEIDO (CAPCELLPAKC18, 6 × 250 mm)、カラム温度：45°C とした。ABA の含まれる分画を回収した後、Kit ELISA ABA (Phytodetek Kits, AGDIA, USA) を用いて ABA 含量を測定した。

結果

加温の有無が萌芽率に与える影響についてみると、両採取日とも日長にかかわらず、露地区に比べ加温区で萌芽率が高かった。また、採取後の萌芽率の推移は、日長にかかわらず、露地区では10月24日に比べ12月10日に萌芽率が低下したのに対し加温区では上昇した。10月24日に採取した試料の水挿し28日後の加温区の萌芽率を除き、いずれの温度区においても日長は萌芽率に影響を及ぼさなかった（第2.1表）。

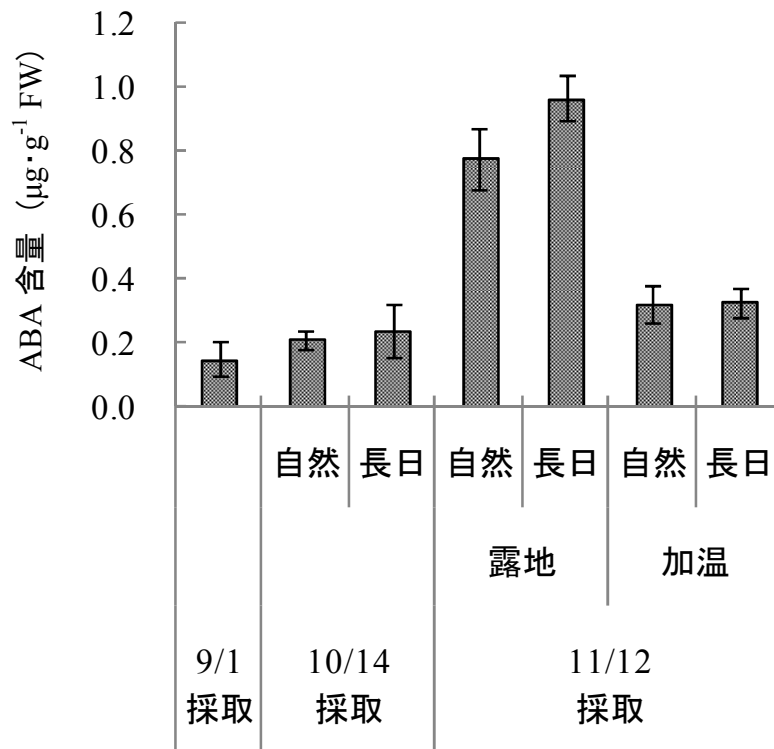
葉芽中のABA含量を分析した結果を第2.2図に示した。処理前の9月1日と加温処理前の10月14日の両日長区間において、ABA含量の明確な差異はみられなかった。11月12日の露地区のABA含量をみると、日長にかかわらずそれ以前に比べ含量が著しく増加した。一方、加温区では日長にかかわらず、明確な増加は確認できなかった（第2.2図）。

第2.1表 温度および日長処理がニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の
休眠導入に及ぼす影響

温度	日長 ^z	萌芽率 (%)					
		枝採取日および促成処理日数					
		10月24日			12月10日		
		14日後	21日後	28日後	14日後	21日後	28日後
加温	長日	18.0 a ^y	40.0 a	60.0 a	36.0 a	50.0 a	60.0 a
	自然	18.0 a	34.0 a	44.0 b	22.0 a	50.0 a	64.0 a
露地	長日	0.0 b	14.0 b	16.0 c	0.0 b	8.0 b	8.0 b
	自然	0.0 b	18.0 b	18.0 c	0.0 b	6.0 b	16.0 b

^z日長処理は9月1日から、温度処理は10月15日から行った
加温：最低気温18℃、自然：自然日長、長日：16時間日長

^y同列内の異なる英文字はTukey-Kramer's HSD tests において5%水準で有意差あり



第 2.2 図 温度および日長処理がニホンナシ ‘ゴールド二十世紀’ の葉芽中の ABA 含量に及ぼす影響

日長処理は 9 月 1 日から，温度処理は 10 月 15 日から行った
 自然：自然日長，長日：16 時間日長，加温：最低気温 18°C，
 図中の縦線は標準誤差を示す (n=5)

第4節 低温処理が自発休眠の導入に及ぼす影響

前節の結果から、ニホンナシの芽が自発休眠に導入するためには秋季の低温が必要であると考えられ、自発休眠導入後の芽では ABA 含量が増加していた。ブドウでは、12~18°C までの温度が休眠導入に有効な温度域とされているが (Nigond, 1967)、ニホンナシをはじめとする多くの落葉果樹では調査されていない。

本節では、ニホンナシの自発休眠導入に有効な温度域と、その遭遇時間について調査を行った。

材料および方法

実験には、鳥取大学農学部附属大塚農場に栽植されている‘ゴールド二十世紀’樹(10年生)5本を用いた。2005年度は、自発休眠への導入温度を調査するため以下の実験を行った。9月30日に発育枝30本を採取し、前節と同様の方法で水挿しした。水挿しした枝は、5または15°Cに設定した恒温室内に5、7または14日間静置した。その後、落葉していなかった葉は摘葉して枝の頂芽を切除し、葉芽5芽が着生している状態で5節ずつに切り分けた。その後、23±0.5°Cの恒温室内に搬入し、5本の枝について前節と同様の方法で28日後の葉芽の萌芽率を調査した。対照区は採取した枝に温度処理を行わず、直ちに23±0.5°Cの恒温室内に移し、28日後の萌芽率を求めた。

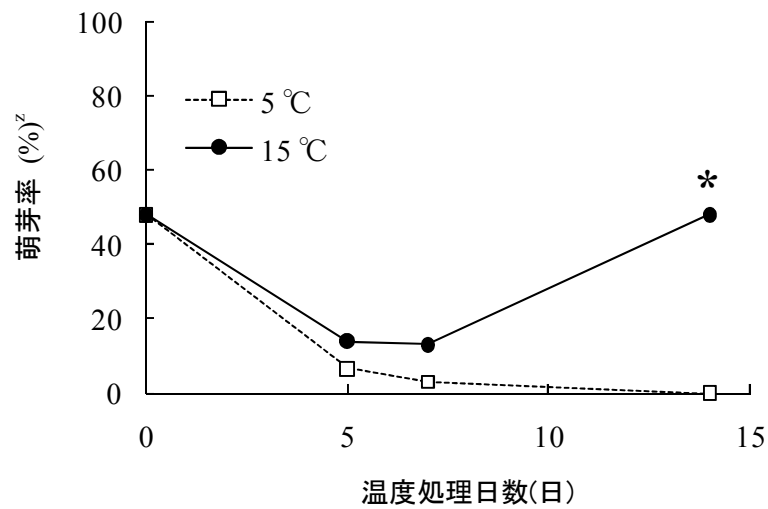
2007年度は、自発休眠導入時の温度変化が自発休眠の導入に及ぼす影響を調査するため、以下の実験を行った。10月14日に採取した発育枝30本を前述のとおり5または15°Cの恒温室内に入れ、15日間静置した。各処理区のうち1/3

の枝は $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の恒温室内に移し、前述の方法で葉芽の萌芽率を求めた。残りの枝のうち 15°C 処理区の枝は 5°C の恒温室へ、 5°C 処理区の枝は 15°C の恒温室へそれぞれ移動し、5 または 15 日間静置した後、 $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の恒温室内に移して葉芽の萌芽率を求めた。対照区は採取した枝に温度処理を行わず、直ちに $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の恒温室内に移して 28 日後の葉芽の萌芽率を求めた。

結果

2005 年 9 月 30 日に採取し、直ちに水挿し加温処理した場合の萌芽率は 48% であった。採取後 5°C に 5 日間置いた後、水挿し加温処理を行った場合の萌芽率は著しく低下し、その後の低温遭遇時間が増加しても萌芽率は低いままであった。一方、採取後 15°C に置くと、5 日後に一旦萌芽率が低下するものの、7 日目以降に再び上昇し、14 日目には処理開始前と同様の値まで上昇した（第 2.3 図）。

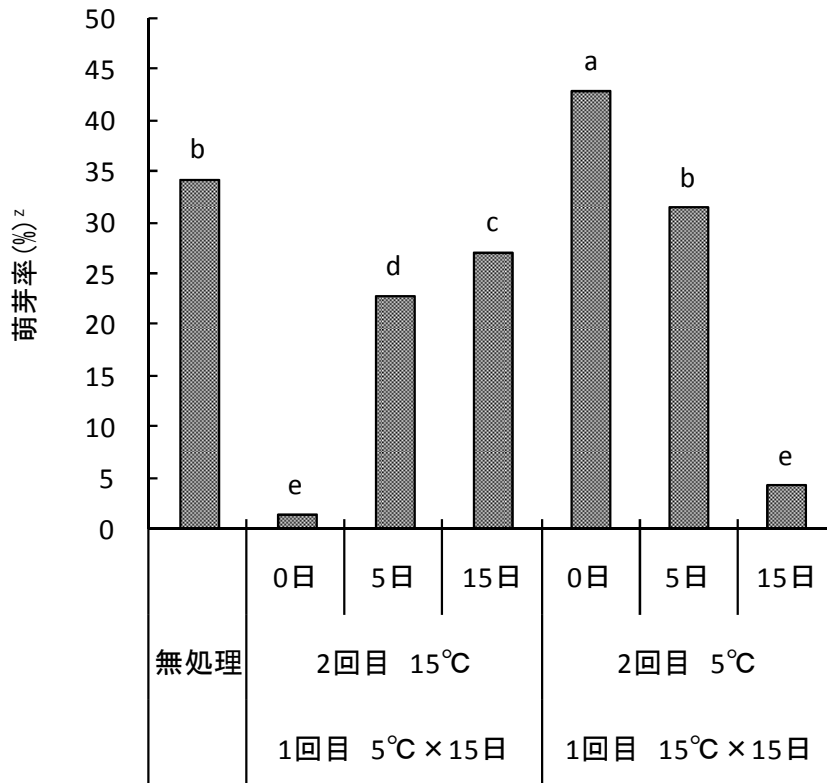
2007 年 10 月 14 日に採取し、直ちに水挿し加温処理した場合の萌芽率は 34% であった（第 2.4 図、無処理区）。採取後 15°C に 15 日間置いた後、水挿し加温処理を行った場合（2 回目 5°C 、0 日）の萌芽率は、10 月 14 日に採取した処理区より高かった。しかし、 15°C に遭遇後 5°C 処理を行うと処理期間の延長とともに萌芽率が徐々に低下し、15 日目には萌芽率 4% と著しく低い値を示した（2 回目 5°C 、15 日）。一方、採取後 5°C に 15 日置くと萌芽率は著しく低下するものの（2 回目 15°C 、0 日）、その枝に 15°C 処理を行うと萌芽率は 20% 以上に上昇した（2 回目 15°C 、5 および 15 日）。



第 2.3 図 温度処理がニホンナシ ‘ゴールド二十世紀’ の自発休眠導入に及ぼす影響

²9月30日に採取し，各温度で処理後 23°C 水挿し加温処理 28 日後に調査

* Student の t 検定により「15°C 処理区」と「5°C 処理区」間において 5%水準で有意差あり



第 2.4 図 気温の変化がニホンナシ ‘ゴールド二十世紀’ の自発休眠導入に及ぼす影響

^z10月14日に発育枝を採取し、15日間の温度処理（5または15°C）後、5または15°C処理遭遇0、5および15日後に23°Cで水挿し加温処理して28日後に調査

図中の異なる英文字は Tukey-Kramer's HSD tests において5%水準で有意差あり

第5節 考察

ニホンナシの自発休眠の導入要因およびその機構を明らかにするため、‘ゴールド二十世紀’のハウス栽培樹と露地栽培樹の自発休眠の推移を比較した。その結果、花芽の自発休眠打破期はハウス区で早かったものの、葉芽の自発休眠打破期は露地区で早かった。また、前章の結果と同様に花芽の自発休眠打破期は葉芽に比べて早く、芽の種類によっても自発休眠打破に必要な低温要求量が異なると考えられた。Gemma (1995) はニホンナシ‘幸水’において、加温栽培した直後の休眠の深度を調査し、加温栽培後の樹の休眠打破が露地状態にあった樹に比べて早い場合があることを示している。また谷口ら (2006) はニホンナシ‘幸水’において、低温および施設加温栽培がニホンナシの自発休眠導入に及ぼす影響を調査しており、加温栽培は露地栽培に比べ自発休眠への導入および自発休眠からの覚醒を早めること、自発休眠への導入は加温栽培による作型の前進化に比べ 5°C の低温による影響が大きいことを報告している。このような品種間の反応の違いの原因は明確ではないが、ニホンナシの場合、品種により休眠打破に有効な温度域も異なる (Tamura ら, 2001) ことから、導入に有効な温度にも差異があるものと予測される。さらに、‘幸水’は‘二十世紀’に比べ自発休眠への導入が早いことが示されており (Tamura ら, 2001)、これらの差異が品種間の反応の違いに関連しているのかもしれない。

一般に落葉果樹の芽の休眠導入は、短日と低温によって誘導されると言われているものの、これを明確にした報告は極めて少なく (Dennis, 1994)、日長であろうとする見解 (Kawase, 1961) と低温によるものとする報告 (東部ら, 1998) とに分かれている。本実験を行った鳥取における 9~12 月期の月別平均日長時間は、それぞれ 12.4, 11.4, 10.5 および 9.9 時間であり、長日処理を行った 16

時間に比べ明らかに短く、仮に短日が休眠導入に関与しているとすれば、長日処理は休眠導入を阻害するものと考えられる。しかし、本実験ではニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の休眠導入は長日条件では阻止できず、日長に関係なく加温により阻害されることは明らかであった（第 2.1 表）。また、短日化と低温遭遇との相乗効果もみられなかった。つまり、ニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の場合、日長に比べ低温が休眠導入に関与していると考えられた。そこで、休眠導入に必要な温度の検討を行ったところ、5°C 条件下では自発休眠状態に入ったと考えられるものの、15°C 条件下では一旦萌芽率は低下したが、遭遇する時間が長くなるとともに休眠の深さが再び浅くなるものと推測された（第 2.3 図）。この温度反応特性は、15°C 条件下に置いた花芽を 5°C 条件下に移動すると、休眠に導入されるものの、5°C 条件下に置いたものを 15°C 条件下に移動すると導入されつつあった休眠が解除されてしまうという結果からも強く示唆されるものである（第 2.4 図）。

近年、秋季の温度が高く推移するため、様々な落葉果樹類において、落葉の遅延や低温順化が十分に行われないうままに厳しい低温に遭遇することによる低温障害の発生（松本ら、2010）などの影響が指摘されている。Tamura ら（1997）は、同緯度である鳥取地区と佐治地区の休眠導入時期を比較した場合、高冷地である佐治地区のほうが約 10～15 日早いことを指摘している。この点と本実験での 15°C 処理による休眠導入阻害とを考え合わせると、今後、自発休眠の導入が大きく遅延することも予想される。また、現在でも寒冷地であれば、暖地より早い時期に自発休眠に導入されていると考えられる。

現在用いられているニホンナシの休眠打破予測法として、Chill unit モデル（Richardson ら、1974；浅野・奥野、1990；Tamura ら、1997）ならびに生育予測モデル（DVI）（Sugiura・Honjo、1997）があげられる。両モデルとも、休眠導

入された時点から積算を始めることが基本的な前提といえる。しかし、起算の開始条件は不明瞭なままであるので、先に指摘した気候変動にともなう導入期の変化があった場合、低温積算の起算条件の再考が必要といえる。この点は現在における休眠打破や開花の予測精度をあげることのみならず、温暖化の予測に基づく品種毎の栽培南限のシミュレーションにも不可欠な知見となる。従って、導入期の温度反応に関するより詳細な実験が必要であろう。

植物の芽の休眠と密接な関連があると考えられている植物ホルモンの一つに ABA があげられる。本研究では、自発休眠導入されなかった区の ABA 含量は休眠導入された区と比べ明らかに低く、明確な関連がみられた(第 2.2 図)。Seely・Powell (1981) は、リンゴの葉芽において ABA 含量は落葉期に最も高く、自発休眠終了時に低くなることから、芽の休眠と ABA 含量の密接な関連を指摘している。一方、Mielke・Dennis (1978) は酸果オウトウにおいて休眠深度と ABA 含量との関連を否定しており、低温積算に関係なく ABA 含量は低下したことを報告している。このように、落葉果樹においては休眠および低温と ABA 含量との関連は明確になっていない。しかし、本研究をみる限り、ニホンナシの休眠導入と ABA 含量の間には一定の関連性があるものと思われる。

第6節 摘要

ハウス栽培，気温および日長がニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の芽の自発休眠の導入に及ぼす影響を調査した．ハウス栽培区は露地栽培区に比べて20日程度花芽分化を促進したが，花芽および葉芽の自発休眠導入期には影響を与えず，自発休眠打破期への影響もわずかであった．ポット樹を用いて長日処理および温度処理の影響を調査したところ，自発休眠導入期の加温は導入を阻止したが，16時間日長は導入を阻害しなかった．そこで，自発休眠導入に有効な温度の調査を行ったところ，5°Cは自発休眠の導入に有効であったが，15°Cは自発休眠の導入を阻害した．11月中旬の露地区における葉芽のABA含量は，低温による自発休眠の導入に伴い上昇したが，加温区では低い値を示した．このように，ニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の葉の自発休眠は，主として秋季の低温によって誘導されるものと考えられた．

第3章 ニホンナシの芽の自発休眠導入および 打破に関する遺伝子の解析

第1節 緒言

前章の結果から、ニホンナシの芽が自発休眠に導入するためには秋季の低温が必要であり、5°Cの低温が導入に有効な温度であると考えられた。また、自発休眠導入後の芽は導入前に比べABA含量が増加しており、多くの指摘のように休眠導入との関連が示唆された。これまでに、落葉果樹の自発休眠期における植物ホルモンの変化については多くの研究が行われており、エチレン (Wang ら, 1985), ジベレリン (Donoho ら, 1957; Erez ら, 1979), サイトカイニン (Chandler ら, 1937; Broom・Zimmerman, 1976; Sterrett・Hipkins, 1980) および ABA (Corgan・Peyton, 1970; Emmerson・Powell, 1978; Seeley・Powell, 1981; 堀内ら, 1981; 田村ら, 1992, 1993; 望岡ら, 1996) と自発休眠打破との関連性が示唆されている。

一方、近年では分子レベルでの研究も盛んに行われており、MIKC-type dormancy-associated MADS-box (DAM) 遺伝子が自発休眠の推移に関連する遺伝子として着目されている。モモ (*Prunus persica*) の DAM 遺伝子の発現量は、自発休眠最深期から打破期にかけて低下すると報告されている (Bielenberg ら, 2004, 2008; Jimenez ら, 2009)。また、メキシコ南部で休眠に導入しないモモとして確認されている evergrowing (evergreen, USDA PI442380) は、休眠に導入するモモに比べ DAM 遺伝子の発現量が著しく低いことも確認されている (Thompson ら, 1985; Rodriguez ら, 1994; Werner・Okie, 1998)。類似した結

果はニホンナシでも示されているが (Ubi ら, 2010), 自発休眠の導入や打破の詳しい機構についてはいまだ不明な点が多い.

本研究では, ニホンナシの自発休眠機構の解明を目的として, ディファレンシャルディスプレイ (DD) 法により自発休眠関連遺伝子を単離した. さらに, 単離した遺伝子については, リアルタイム PCR 法により発現解析を行った.

第2節 自発休眠導入および打破に関する

候補遺伝子の単離

近年、自発休眠機構の解明を目的とした分子レベルでの研究が広く行われている。しかしながら、これまでの研究では自発休眠打破に着目した研究が多く、導入に関する候補遺伝子は少ない。

サブトラクション法は、2種類の mRNA 間で発現レベルの異なる遺伝子を単離するのに有効な手法であり、自発休眠打破に関連した候補遺伝子の単離も行われている (Yamane ら, 2008)。一方、DD 法は一度に複数の mRNA 間を比較することが可能であるが、PCR による非特異的な増幅が頻繁に起こるという欠点が指摘されている。この問題を解消するため、近年開発された GeneFishingTM DEG Premix Kit (Seegene, Korea) には Annealing Control Primer (ACP) が使用されており、非特異的なアニーリングを防ぎ擬陽性産物の合成を抑制することに成功している (Kim ら, 2004)。本節では、自発休眠導入期、最深期、打破期の3ステージ間で発現レベルが異なる遺伝子を GeneFishing 法で単離し、相同性検索の結果から自発休眠に関する候補遺伝子を決定した。

材料および方法

実験には、鳥取大学農学部附属大塚農場に栽植されている‘ゴールド二十世紀’樹 (21年生) を用いた。2009年11月12日から2010年2月18日まで定期的に1年枝と葉芽を採取し、前章と同様の方法で葉芽の萌芽率を観察した。また、採取した葉芽は液体窒素で凍結させた後、 -80°C で保存した。

< total RNA の抽出および cDNA の合成 >

自発休眠導入期 (11 月 12 日), 自発休眠最深期 (1 月 15 日) および自発休眠打破期 (2 月 18 日) に採取した葉芽 0.5 g から Hot Borate 法 (Wan・Wilkins, 1994) により total RNA を抽出した. 抽出後は, GeneFishing™ DEG Premix Kit (Seegene, Korea) を用いて, cDNA を合成した. 合成には 5 µg の total RNA を用い, 4 µL の Reaction buffer (TaKaRa, Tokyo, Japan) , 5 µL の 2 mM dNTPs, 2 µL の 10 µM dT-ACP1 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT (18) -3') , 0.5 µL の RNase Inhibitor (40U/µL, TaKaRa) および 1 µL の MMLV reverse transcriptase (200U/µL, TaKaRa) を加えた全 20 µL で 42°C (1 時間半) の合成反応を行った. 合成後の cDNA は 22 µL の滅菌水で希釈し, GeneFishing PCR を行うまで -20°C で保存した.

< GeneFishing PCR およびクローニング >

GeneFishing™ DEG Premix Kit (Seegene, Korea) の全 120 セットのプライマーを用いて GeneFishing PCR を行った. 7 µL の cDNA に 1 µL の dT-ACP2 (10 µM) , 2 µL の 5 µM arbitrary ACP, 10 µL の 2 × Master Mix を加えた全 20 µL を反応液とした. PCR は 94°C で 5 分, 50°C で 3 分, 72°C で 1 分の反応を 1 サイクル行った後, 94°C で 40 秒, 65°C で 40 秒, 72°C で 40 秒の反応を 40 サイクル, 最後に 72°C で 5 分の反応を行った.

PCR 後の反応溶液は 2%のアガロースゲルを用いて泳動を行い, 3ステージ間でバンド強度に差がみられたバンドを切り出した. 切り出したゲルを gel extraction kit (Qiagen, Tokyo, Japan) により精製した後, pGEM-T Easy Vector (Promega) を用いてサブクローニングを行った.

< DNA シークエンスおよび配列の相同性検索 >

シークエンス反応溶液の調節には BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用し, Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した. 各クローンの相同性検索には, GenBank/EMBL/NCBI の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) X を使用した.

結果

‘ゴールド二十世紀’の11月12日の萌芽率は56%であった. その後, 萌芽率は徐々に低下し, 1月15日には0%になった(第3.1表). 2月18日には68%に上昇したため, 自発休眠導入期(11月12日), 自発休眠最深期(1月15日)および自発休眠打破期(2月18日)の3ステージを決定した.

全120セットのプライマーを使用し, 3ステージ間でバンド強度の異なる124個のcDNAを単離した. そのうち, 導入期, 最深期および打破期でバンド強度が強かったクローンは, それぞれ30, 54, 19クローンであった. また, 導入期と打破期の両ステージでバンド強度が強かったクローンは21クローンであった.

また, BLASTXによる相同性検索の結果, 12個の遺伝子が機能性遺伝子として確認された(第3.2表).

第 3.1 表 2009 年から 2010 年における ‘ゴールド二十世紀’ の葉芽の萌芽率

採取日 (月/日)	萌芽率 (%) ^Z
11/12	56.0 a ^Y
12/4	20.0 b
1/15	0.0 b
1/31	8.0 b
2/18	68.0 a

^Z23°C で水挿し加温処理し 28 日後に調査

^Y 同列内の異なる英文字は χ^2 検定において 5%水準で有意差あり

第 3.2 表 BLASTX による相同性検索の結果

ステージ	クローン (No.)	cDNA (bp)	相同性遺伝子	E 値	Accession number
導入期	8	470	40S ribosomal protein S4 (<i>Prunus armeniaca</i> ; 081363)	1e ⁻³⁰	AB721409
	53	561	PREDICTED: hypothetical protein (<i>Vitis vinifera</i> ; XP_2285166)	4e ⁻³¹	AB721410
	115	369	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (<i>Plantago major</i> ; CAJ43712)	5e ⁻⁰⁸	AB721411
最深期	11	484	Dormancy-associated protein (<i>Codonopsis lanceolata</i> ; AAW02792)	3e ⁻¹⁸	AB721412
	15	662	Tonoplast intrinsic protein 1 (<i>Mimosa pudica</i> ; BAD90703)	2e ⁻⁷³	AB721408
	205	407	Thaumatococin-like protein (<i>Pyrus pyrifolia</i> ; ACN97419)	2e ⁻³²	AB721416
	224	397	Fructose-bisphosphate aldolase, putative (<i>Ricinus communis</i> ; XP_002533605)	2e ⁻²⁸	AB721417
打破期	245	307	Auxin influx carrier component (<i>Populus trichocarpa</i> ; XP_002309128)	3e ⁻¹⁴	AB721419
導入期	19	567	Auxin-responsive family protein (<i>Brassica rapa</i> ; ABV89626)	8e ⁻¹⁹	AB721413
	24	633	Protein CYPRO4, putative (<i>Ricinus communis</i> ; XP_002518769)	4e ⁻⁴³	AB721414
打破期	40	481	E3 ubiquitin ligase PUB14, putative (<i>Ricinus communis</i> ; XP_002510099)	1e ⁻⁴⁰	AB721415
	236	364	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase, putative (<i>Ricinus communis</i> ; XP_002524583)	8e ⁻¹³	AB721418

第3節 自発休眠期における候補遺伝子の発現量の変化

(発現解析 1)

前節で行った DD 法により，自発休眠の導入期，最深期および打破期の 3 ステージ間で増幅バンド強度の異なる 124 個の cDNA を単離することに成功し，そのうち 12 個の機能性遺伝子が確認された．GeneFishing PCR による各ステージ間のバンド強度の差は，発現量の違いを反映していると推測される．しかしながら，単離された遺伝子と自発休眠の推移との関係性を調査するためには，さらに詳しい発現解析を行う必要がある．

本節では，12 個の機能性遺伝子について自発休眠の 3 ステージ間における発現量の違いをリアルタイム PCR 法で解析した．その後，ステージ間で発現量に有意な差が確認された遺伝子については，自発休眠の導入期から打破期まで定期的に採取した葉芽内における発現量の変化について調査を行った．

材料および方法

前節で 2009 年 11 月 12 日から 2010 年 2 月 18 日まで定期的に採取した葉芽の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した．前節と同様の方法で total RNA の抽出および cDNA の合成を行った後，希釈溶液をさらに滅菌水で 100 倍希釈したものを解析用のサンプルとした．

< リアルタイム PCR >

リアルタイム PCR には LightCycler (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を使用した．3 μ L の SYBR Green Mastermix (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) に各遺

伝子に特異的な 1 μM のプライマーセット（第 3.3 表）と滅菌水を加え、15 μL の reaction mix を調製した。reaction mix に希釈後の cDNA 5 μL を加え、リアルタイム PCR は 95°C で 10 分の反応を 1 サイクル行った後、95°C で 10 秒、60°C で 5 秒、72°C で 12 秒の反応を 40 サイクル行った。その後、65°C から 95°C まで 0.2°C \cdot s⁻¹ の反応を行い、プライマーの特異性を確認した。なお、各プライマーの設計には Primer3 (version 0.4.0) を使用し、Actin の発現量から相対発現量を算出した。

結果

12 個の機能性遺伝子について自発休眠の 3 ステージ間における発現量の違いをリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、GeneFishing PCR のバンド強度と同様の発現パターンを示し、3 ステージ間で有意な発現量の差が確認された 8 クローンを自発休眠の導入および打破に關与する候補遺伝子とした（第 3.1 図）。

候補遺伝子について、自発休眠の導入期から打破期まで定期的に採取した葉芽内における発現量の変化について調査を行った結果、発現パターンの違いから候補遺伝子は 4 つのタイプに分類された（第 3.1 図）。

タイプ 1：導入期で発現量が高く、その後は発現量が低下する遺伝子

(No. 53)

タイプ 2：最深期で発現量が高く、導入期と打破期では発現量が低い遺伝子

(No. 15, 205, 224)

タイプ 3：導入期と最深期では発現量が低く、打破期で発現量が高い遺伝子

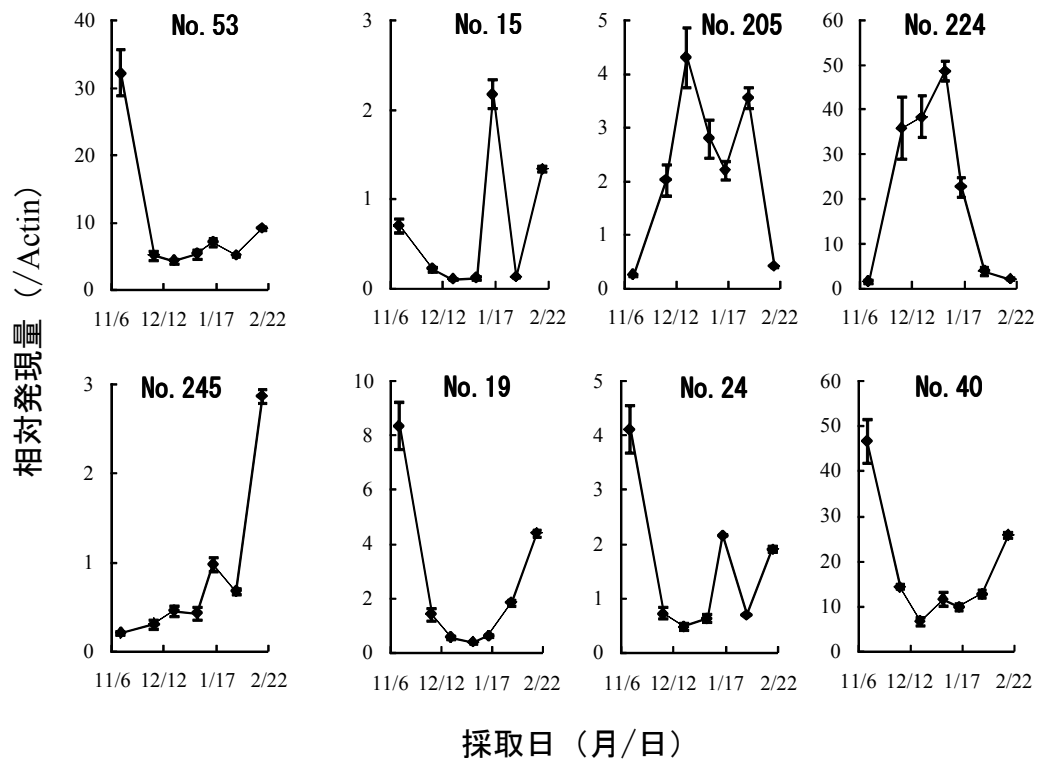
(No. 245)

タイプ 4：導入期と打破期で発現量が高く、最深期では発現量が低い遺伝子

(No. 19, 24, 40)

第 3.3 表 リアルタイム PCR に使用したプライマー

クローン (No.)	プライマー	プライマーの配列 (5'→3')	増幅断片長 (bp)
53	Forward	GGGCATTACAGGGCGTTTG	120
	Reverse	TCATCAAACCTTACCATCCTACC	
15	Forward	CCAGAGCGTTCATACACTGAC	93
	Reverse	TCGTTGCTTGCTTGCTCCT	
205	Forward	CGAATAATACGCCGGAGACA	124
	Reverse	GGTCCACCACTGCAGGTAAG	
224	Forward	TTCTCCTTCGGACGTGCTCT	116
	Reverse	GCTTCTGAGTTGGCCTTGGT	
245	Forward	CTACCAGTGCCCTCCCAAAG	100
	Reverse	GAAAGGCAAATGCAGGACA	
19	Forward	GGTCACCACCATCGTTCACA	126
	Reverse	CACAAACCTCTCTGCTTCATTCC	
24	Forward	ACGCAAAGAACAATCCCAGA	126
	Reverse	GCAACCCGATGAAAGTGAG	
40	Forward	GACGTGGCGGCGAATTA	103
	Reverse	CCAAGCAAAAGGCGGAGA	
Actin	Forward	CAGGCATTACGAGACCACA	112
	Reverse	TGCCAGGGAACATGGTAGAA	



第 3.1 図 自発休眠の推移に伴う候補遺伝子の発現量の変化

第4節 導入期のニホンナシと台湾ナシの芽における 候補遺伝子の発現量の比較（発現解析2）

前節で行った発現解析の結果、8 クローンを自発休眠の導入および打破に関与する候補遺伝子として選抜し、発現パターンの違いから候補遺伝子は4つのタイプに分類された。

その中には、導入期から最深期にかけて発現量が低下する遺伝子や増加する遺伝子が確認された。しかしながら導入期と最深期とでは、外気温が大きく異なっており、候補遺伝子の中には低温により発現量が変化した遺伝子もあると考えられる。そのため、候補遺伝子と自発休眠導入との関係について詳しく調査するためには、自発休眠導入期が異なる種間における発現パターンを比較する必要がある。

現在、モモ (*Prunus persica* L. Batsch) では自発休眠に導入しない‘Evergreen’ peach が確認されており、自発休眠の機構解明を目的とした研究を行ううえで研究対象として注目されている (Rodriguez ら, 1994)。一方、ナシでも熱帯地域の台湾在来ナシである横山は自発休眠に導入しないと考えられている。

そこで本節では、ニホンナシの自発休眠導入期にあたる11月中旬と12月中旬における台湾ナシの萌芽率を調査するとともに、同時期の両種間における候補遺伝子の発現量の比較を行い、候補遺伝子と自発休眠導入との関連性について調査を行った。

材料および方法

実験には、鳥取大学農学部附属大塚農場に栽植されているニホンナシ ‘ゴールド二十世紀’ (21 年生) とタイワンナシ横山 (8 年生) を用いた。2010 年 11 月 15 日および 12 月 15 日に 1 年枝と葉芽を採取し、前章と同様の方法で葉芽の萌芽率を観察した。また、採取した葉芽は前節と同様の方法で cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法により発現解析を行った。

結果

ニホンナシ ‘ゴールド二十世紀’ の萌芽率は、11 月 15 日から 12 月 15 日にかけて 36% から 8% に低下した (第 3.4 表)。一方、タイワンナシ横山の萌芽率は 11 月 15 日および 12 月 15 日の両日ともに 76% と ‘ゴールド二十世紀’ に比べて高く、11 月中旬から 12 月中旬にかけて低下することはなかった。

リアルタイム PCR による発現解析の結果、No. 53 (タイプ 1) および No. 15 (タイプ 2) の発現量は、ニホンナシおよびタイワンナシの両種で導入期から最深期にかけて低下した (第 3.2 図)。また、No. 205 (タイプ 2) の発現量は、両種とも導入期から最深期にかけて増加した。一方、No. 224 (タイプ 2) および No. 245 (タイプ 3) はニホンナシにおいて導入期から最深期にかけて低下したが、対照的にタイワンナシでは増加し、両種間で発現パターンが異なった。

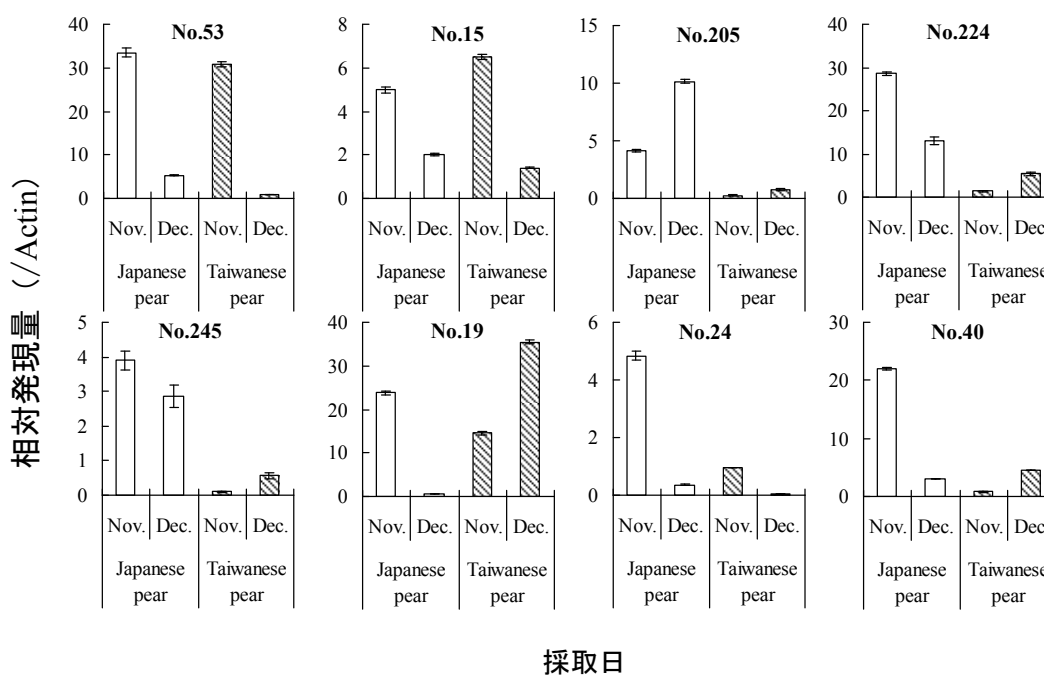
タイプ 4 の No. 19, 24 および 40 は、3 クローンともニホンナシにおいて導入期から最深期にかけて発現量が低下した。No. 24 はタイワンナシでも同様の発現パターンを示したが、No. 19 と 40 は最深期に発現量が増加した。さらに、タイワンナシの最深期における No. 19 は、同時期のニホンナシに比べ高い発現量を示した。

第 3.4 表 2010 年の ‘ゴールド二十世紀’ と横山の萌芽率

品種	萌芽率 (%) ^Z	
	11 月 15 日	12 月 15 日
ゴールド二十世紀 (ニホンナシ)	36.0 b ^Y	8.0 b
横山 (台湾ナシ)	76.0 a	76.0 a

^Z23°C で水挿し加温処理し 28 日後に調査

^Y 同列内の異なる英文字は χ^2 検定において 5%水準で有意差あり



第 3.2 図 ニホンナシと台湾ナシにおける候補遺伝子の発現量の変化

第5節 シアナミド処理による候補遺伝子の発現量の変化 (発現解析3)

前節で行った萌芽率の調査の結果, 11月中旬から12月中旬にかけても台湾ナシの萌芽率は高く自発休眠には導入しなかった. また, 候補遺伝子の中にはニホンナシと台湾ナシで異なった発現パターンを示す遺伝子も確認され, そのような遺伝子は気温の変化のみによって発現量が変わるのではなく, 自発休眠導入と何らかの関係があると推測された. このような発現解析を行うことで, 候補遺伝子をより絞り込むことが可能であると考えられる.

これまで, 自発休眠打破に関しては多くの研究が行われており, 休眠打破剤についても多くの報告がある. 有効性が確認されている休眠打破剤としては, シアナミド (黒井ら, 1963 ; Iwasaki・Weaver, 1977 ; 森元・能代, 1978 ; Shulmanら, 1983), ニンニク精油 (Kubota・Miyamuki, 1992) および過酸化水素 (Kurodaら, 2005) などが挙げられ, ブドウ等ですでに実用化されている. また, シアナミド処理による休眠打破効果は, ニホンナシでも確認されている (黒木ら, 2009).

そこで本節では, 自発休眠最深期にシアナミド処理を行った芽と処理を行っていない芽における候補遺伝子の発現量を比較し, 候補遺伝子と自発休眠打破との関連性について調査を行った.

材料および方法

実験には、鳥取大学農学部附属大塚農場に栽植されているニホンナシ‘ゴールド二十世紀’（21年生）を用いた。2011年1月15日に1年枝を採取し、採取した半分の枝にはシアナミド処理を行った。シアナミド処理は0.01%のTween 20を含む1%（v/v）シアナミド溶液に5秒間浸して行い、残りの半分の枝は0.01%のTween 20を含む滅菌水に浸し対照区として設けた。両処理区の枝については、前章と同様の方法で葉芽の萌芽率を観察した。また、処理前および処理後24、72時間後に両処理区の葉芽を採取し、採取した葉芽は前節と同様の方法でcDNAを合成し、リアルタイムPCR法により発現解析を行った。

結果

ニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の1月15日の対照区の萌芽率は16%であった（第3.5表）。一方、シアナミド処理区の萌芽率は60%であった。

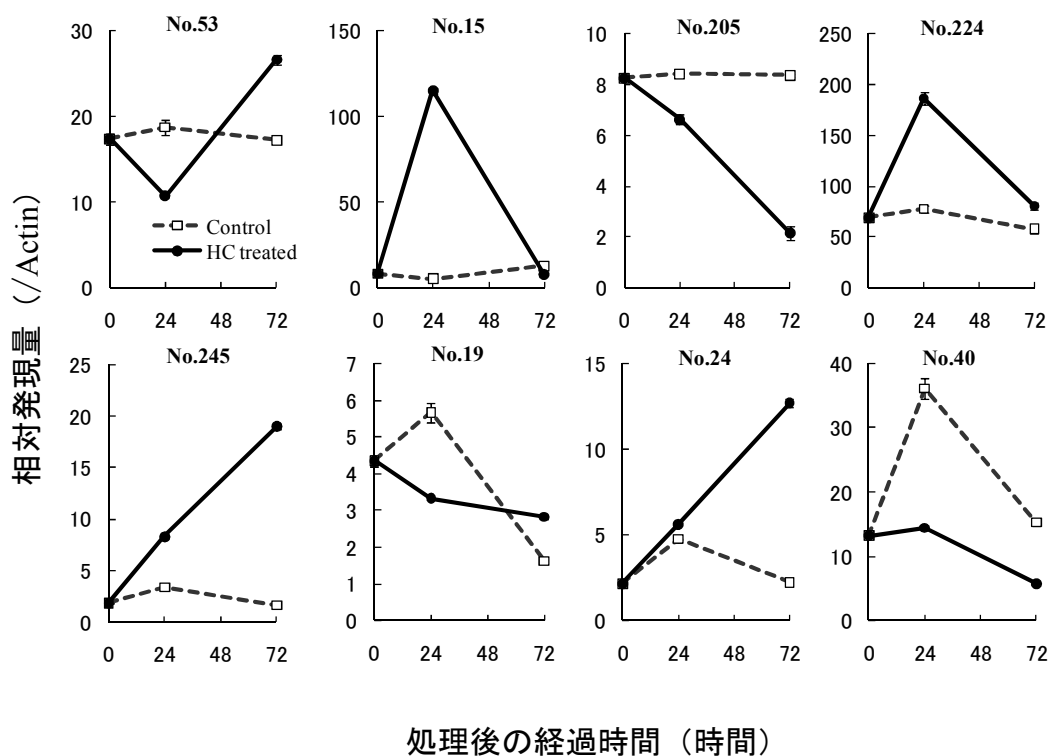
発現解析の結果、タイプ1、2、3の5クローンの対照区では、シアナミド処理区に比べ24時間後および72時間後の発現量の変化が小さかった（第3.3図）。No. 53（タイプ1）のシアナミド処理区では、発現量が24時間後に低下し、72時間後は対照区より高い値を示した。一方、No. 15とNo. 224（タイプ2）では24時間後に発現量が増加し、72時間後には対照区と同程度の値まで低下した。また、No. 205（タイプ2）のシアナミド処理区は時間の経過に伴い発現量が低下した。対照的に、No. 245（タイプ3）のシアナミド処理区では処理後、徐々に発現量が増加した。タイプ4のNo. 19、24、40の対照区では24時間後に発現量が増加し、72時間後には低下した。No. 19と40のシアナミド処理区では、処理後、わずかに発現量が低下したが、No. 24は徐々に増加した。

第 3.5 表 シアナミド処理による‘ゴールド二十世紀’の萌芽率の変化

処理区	萌芽率 (%) ²
対照区	16.0 *
シアナミド処理区	60.0

²23°C で水挿し加温処理し 28 日後に調査

*は χ^2 検定において 5%水準で有意差あり



第 3.3 図 シアナミド処理による候補遺伝子の発現量の変化

第6節 考察

これまでに、自発休眠期における植物ホルモン含量や代謝の変化について多くの研究が行われている (Powell, 1987 ; Dennis, 1994). 近年では、自発休眠の推移によって発現量が増減する遺伝子として DAM 遺伝子が自発休眠を制御する遺伝子として着目されており、キイチゴ (*Rubus idaeus*), ウメ (*Euphorbia esula*), モモやナシで研究されている (Li ら, 2009 ; Mazzitelli ら, 2007 ; Ubi ら, 2010 ; Yamane ら, 2008). しかしながら、落葉果樹の芽の自発休眠については不明な点が多く、生理的な機構の解明には至っていない。

本章では、ニホンナシの自発休眠機構の解明を目的とし、‘ゴールド二十世紀’の自発休眠導入および打破に関与する遺伝子を単離し発現解析を行った。全 120 セットのプライマーを使用し、自発休眠の導入期 (11 月 12 日), 最深期 (1 月 15 日), 打破期 (2 月 18 日) の 3 つのステージ間で増幅バンド強度を比較した結果、124 個の cDNA クローンの単離に成功した。そのうちの機能性遺伝子と高い相同性が確認された 12 クローンについて 3 ステージ間で発現解析を行い、候補遺伝子を 8 クローンに絞った後、季節的な変化に伴う発現量の変化を調査した。その結果、発現量の変化から候補遺伝子を 4 パターンにグループ分けすることが出来た。しかしながら、自発休眠の導入および打破に関与する遺伝子を同定するためには、さらに詳しく解析を行う必要がある。

これまでの研究では、自発休眠を導入しないモモが ‘Evergreen’ peach として確認されているが、ナシでは知見が乏しい (Rodriguez ら, 1994). Tamura ら (2001) は、鳥取におけるナシの自発休眠の推移について調査を行い、ニホンナシの ‘二十世紀’ に比べ野生種や中国ナシの自発休眠導入期が遅かったことを報告している (Tamura ら, 2001). さらに、本研究に用いた熱帯に生育するタイワンナ

シは、調査時において自発休眠には導入しなかった。一方、最深期に行ったシアナミド処理では打破効果がみられ、発現解析 2 と 3 では、これらの葉芽を用いての解析を行った。

ニホンナシとタイワンナシの秋季における候補遺伝子の発現量の変化を調査した結果、発現解析 1 で導入期から最深期にかけて発現量が低下した No. 53, No. 15 および No. 24 は、発現解析 2 でもニホンナシおよびタイワンナシの両種において 11 月から 12 月にかけての発現量の低下がみられた。そのため、これらの遺伝子の発現レベルの低下は休眠の導入によって起こるのではなく、低温積算が引き金になっていると考えられた。

一方、No. 19 と No. 40 も発現解析 1 および 2 でニホンナシにおいては 11 月から 12 月にかけての発現量の低下がみられたが、タイワンナシでは逆に発現量が増加した。No. 19 は Auxin-responsive family protein をコードする遺伝子と高い相同性を示した。また、発現解析 1 で最深期から打破期にかけて発現量が増加し、発現解析 3 でもシアナミド処理により発現量が徐々に増加した No. 245 は Auxin influx carrier component と高い相同性を示した。

これまでの研究では、内生 IAA 含量が自発休眠導入期に低下し打破期に増加することが確認されている（田村ら、1992）。また、No. 40 は E3 ubiquitin ligase PUB14 をコードする遺伝子と高い相同性を示した。E3 ユビキチンリガーゼはタンパク質にユビキチンを結合させるタンパク質の一種であり、オーキシンと E3 ユビキチンリガーゼが結合し、AUX / IAA タンパク質をユビキチン化することが報告されている（Pan ら、2009）。近年の研究では、ヤマナラシ (*Populus tremula* × *P.tremuloides*) の自発休眠導入後にオーキシン処理を行っても AUX / IAA 遺伝子の発現誘導されないことが確認されている（Baba ら、2011）。さらに、自発休眠に関与する転写調節因子として知られている MADS box protein family は、

ユビキチンリガーゼとオーキシンの複合体によって誘導されている (Chao ら, 2007). これらの研究から, ユビキチンリガーゼとオーキシンの複合体は自発休眠の導入や打破を制御する因子であると考えられ, 本研究での結果もこれを支持するものといえる.

一方, No. 15 と No. 205 は水の輸送や脱水反応に関わる機能性遺伝子として確認された. 自発休眠導入時には細胞内で脱水反応が起こっており, 対照的に打破期では水分含量の増加が報告されている (望岡ら, 1996). No. 205 は不凍タンパク質の一つとして知られている Thaumatin-like protein をコードする遺伝子と高い相同性を示しており (Ferullo・Griffith, 2001 ; Griffith ら, 2005), この遺伝子は発現解析 1 では最深期から打破期にかけて発現量が低下している. さらに, この遺伝子の発現量はシアナミド処理後も徐々に低下した. また, 発現解析 1 で導入期から最深期にかけて発現量が増加し打破期には低下した No. 15 は膜タンパク質であるアクアポリンの一種である Tonoplast intrinsic protein (TIP) 1 をコードする遺伝子と高い相同性を示した. 低温に対する反応や適応に関する機構には多くのアクアポリンが関与しており (Mauel, 2007), Yooyongwech ら (2009) は, モモの自発休眠期における Pp- γ TIP1 遺伝子の発現レベルが少低温要求性品種に比べ多低温要求性品種で高いことを示している. これらの研究からも, 自発休眠期における芽の水分含量の調節を担う遺伝子が自発休眠の導入や打破を調節している可能性があるものと考えられる.

また, 本研究で解析した No. 19 と No. 40 の発現レベルの低下は自発休眠導入期, No. 15 と No. 224 の自発休眠打破前における発現量の一時的な増加と自発休眠打破前の No. 205 の発現量の低下や No. 245 の発現量の増加は打破期を指標する発現マーカーになると期待される.

第7節 摘要

ニホンナシの自発休眠機構の解明を目的として、DD法により自発休眠の導入および打破に關与する候補遺伝子を単離した。GeneFishing™ DEG Premix Kitの全120プライマーセットを使用し、導入期、最深期および打破期でバンド強度の異なる124個のcDNAクローンを単離した。そのうち、導入期、最深期および打破期でバンド強度が強かったクローンは、それぞれ30、54、19クローン、導入期と打破期の両ステージでバンド強度が強かったクローンは21クローンであった。BLASTXによる相同性検索の結果、12個の遺伝子が機能性遺伝子として確認され、ステージ間で有意な発現量の差がみられた8クローンについてリアルタイムPCR法で発現解析を行った。ニホンナシの自発休眠導入期から最深期にかけて発現量が低下したNo. 19とNo. 40の2つの遺伝子は、同時期のタイワンナシの芽において発現量が増加した。この2つの遺伝子は、それぞれAuxin-responsive family proteinとE3 ubiquitin ligaseをコードする遺伝子と高い相同性を示すことが確認された。No. 15はTonoplast intrinsic protein (TIP) 1, No. 205はThaumatococcus-like proteinをコードする遺伝子と高い相同性を示し、これらの遺伝子は最深期から打破期にかけて発現量が低下した。またNo. 15はシアナミド処理24時間後に発現量が増加した後、72時間後には低下し、No. 205はシアナミド処理後、徐々に発現量が低下した。

これらの遺伝子は、自発休眠の導入および打破の調節に關与していると考えられた。

第4章 ニホンナシの芽の自発休眠打破に關与する タンパク質の解析

第1節 緒言

前章の研究によって、ニホンナシの自発休眠導入および打破に關与するいくつかの遺伝子の単離に成功し、その中には水の輸送や脱水反応に關わる機能的な遺伝子も確認された。

一般に、温帯性の植物は低温に遭遇することによりハードニング（低温順化）され耐凍性を獲得するが、この際に様々な遺伝子の発現がみられる。近年、耐凍性増大の過程で発現するタンパク質の存在が明らかにされてきた (Guy, 1990)。これまでの研究では、ウメの芽を用いたタンパク質の二次元電気泳動により、休眠期あるいは休眠覚醒期において発現の消長がみられた *dehydrin* 様タンパク質が確認されている (山根ら, 2003)。また Arora ら (1996) は、落葉性のモモと自発休眠を導入しない ‘Evergreen’ peach における 19 kDa の樹皮貯蔵タンパク質 (BSP) について研究を行っており、落葉性のモモでは低温馴化により BSP が減少するが、‘Evergreen’ peach では発現量の変化が確認されなかったと報告している。さらに、Tamura ら (1998) は秋季から冬季におけるニホンナシの花芽中のタンパク質を二次元電気泳動により分離し比較した結果、19 kDa のタンパク質は 11 月下旬から 12 月上旬にかけて消失し、同時にやや塩基性側に同一分子量のタンパク質を検出している。

これに加え近年では、多数のタンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析法を用いた研究も増えている。モモでは、花芽と葉芽の萌芽期の差に着目し、

同時期における両芽のプロテオーム解析の結果から、萌芽期には過酸化水素含量を調節する多くの酵素が確認されている (Prassions ら, 2011). オウシュウアカマツ (*Pinus sylvestris*) では、萌芽期における休眠頂芽内のタンパク質の解析から、膜タンパク質や Caffeoyl - CoA - O - methyltransferase の発現量が休眠打破期で高いと報告されており (Bi ら, 2011), 本研究の前章で単離された遺伝子の中にも、これらをコードする遺伝子が確認されている. 自発休眠機構の詳細について解明するためには、遺伝子の発現解析のみでは不十分であり、翻訳産物であるタンパク質の有無についての知見を得ることが必要不可欠である.

本章では、自発休眠最深期と打破期の芽で発現しているタンパク質を比較し、質量分析法によりタンパク質の同定を行った.

第2節 自発休眠打破に關与するタンパク質の

二次元電気泳動

前章で単離された遺伝子をはじめ、自発休眠の打破期では多くの遺伝子の発現量が増減していると考えられる。しかしながら、それらの翻訳産物であるタンパク質の発現に着目した研究は少ない。

Tamura ら (1998) は秋季から冬季におけるニホンナシの花芽中の全タンパク質含量が 10 月上旬から 12 月上旬にかけて約 2 倍に増加し、その後も自発休眠から他発休眠へ移行する際の芽中の代謝の活性化を示すように、タンパク質含量の増加が確認されている。さらに、ニホンナシの花芽中のタンパク質を二次元電気泳動により分離し比較した結果、19 kDa のタンパク質は 11 月下旬から 12 月上旬にかけて消失し、同時にやや塩基性側に同一分子量のタンパク質が検出されている (Tamura ら, 1998)。二次元電気泳動は分離能が非常に高く、近年はプロテオーム解析においても中心的な役割を担っており、再現性と解像度に優れた固定化 pH 勾配 (Immobilized pH Gradient, IPG) 法を一次元目の泳動に用いることが一般的になっている。

本節では、自発休眠最深期、打破期およびシアナミド処理後の葉芽から抽出したタンパク質を二次元電気泳動で比較し、自発休眠打破に關与するタンパク質の解析を行った。

材料および方法

実験には、鳥取大学農学部附属大塚農場に栽植されている‘ゴールド二十世紀’樹（21年生）を用いた。2009年12月24日および2010年2月16日に1年枝を採取し、半分の枝は前章と同様の方法でシアナミド処理を行った。残りの半分の枝は0.01%のTween 20を含む滅菌水に浸し対照区として設け、両処理区の枝については、前章と同様の方法で葉芽の萌芽率を観察した。処理24時間後に両処理区の葉芽を採取し、液体窒素で凍結させた後、 -80°C で保存した。

< タンパク質の抽出および定量 >

タンパク質の抽出は Damerval ら（1986）の方法に従い行った。まず、試料0.2gを液体窒素中で磨砕後、0.07% (v/v) 2-メルカプトエタノールを含む10% (w/v) TCA - アセトン溶液に懸濁した。懸濁後、 -18°C 下で45分間静置した後、遠心分離（11,000 rpm, 15分間, -9°C ）を行った。再び、ペレットにアセトン（0.07% 2-メルカプトエタノールを含む）を加えて懸濁し、 -18°C 下で1時間静置した。その後、遠心分離（11,000 rpm, 15分間, -9°C ）を行い、ペレットを減圧下で乾燥させ、サンプル緩衝液〔9M 尿素, 2% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 8 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF)〕を加え懸濁した。懸濁後はエッペンチューブに移し、遠心分離（11,000 rpm, 20°C の条件で10分間）した後の上清を泳動用試料とした。なお、上清はエッペンチューブに分注し、分析まで -80°C で保存した。

タンパク質の定量は Ramagli ら（1985）の方法に従い、Bio-Rad Bradford reagent（Bio-Rad 社）を用い、分光光度計により595nmの吸光度からタンパク質量を算出した。

< タンパク質の二次元電気泳動 >

泳動用試料に DeStreak Rehydration Solution (GE ヘルスケア) および IPG Buffer pH 4-7 (GE ヘルスケア) を加え, Immobiline DryStrip pH 4-7 (GE ヘルスケア) を一晩静置し膨潤させ 1-D ゲルとした. その後, 1-D ゲルを水平式電気泳動装置 (Multiphor II, GE ヘルスケア) 上に置き, 第 4.1 表に示した条件で一次元電気泳動を行った.

一次元電気泳動終了後, 1-D ゲルを取り出し, SDS 平衡化バッファーA [50mM Tris-HCl (pH 6.8), 6M 尿素, 30% (v/v) グリセロール, 1% (w/v) SDS, 0.25% (w/v) DTT] で 15 分間, SDS 平衡化バッファーB [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6M 尿素, 30% (v/v) グリセロール, 1% (w/v) SDS, 4.5% (w/v) ヨードアセトアミド, 0.002% (w/v) ブロモフェノールブルー] で 15 分間平衡化した. その後, 1-D ゲルを ExcelGel SDS XL Gradient 12-14 (GE ヘルスケア) 上に置き, 水平式電気泳動装置により, 第 4.2 表に示した条件で二次元電気泳動を行った. また, 泳動終了後のゲルは銀染色法で染色した.

第 4.1 表 IEF-PAGE (一次元目) の条件

Step	Voltage	mA	W	Vh
1	500	1	5	8
2	3500	1	5	3000
3	3500	1	5	57000

第 4.2 表 SDS-PAGE (二次元目) の条件

Step	Voltage	mA	W	h
1	1000	20	40	0:45
2	1000	40	40	0:05
3	1000	40	40	2:40

結果

ニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の12月24日の対照区の萌芽率は0%であった(第4.3表)。一方、同日のシアナミド処理区の萌芽率は80%であった。2月16日における対照区の萌芽率は54%、シアナミド処理区の萌芽率は84%であった。

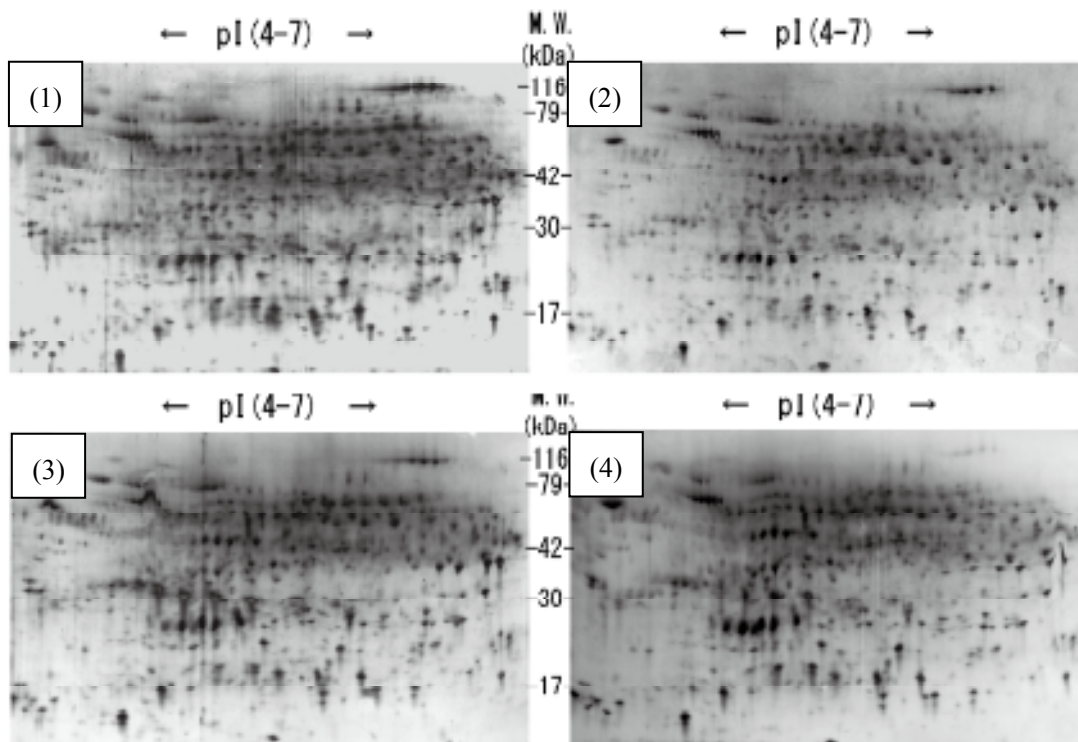
二次元電気泳動後のゲルを銀染色法で染色した結果、2009年12月24日および2010年2月16日の対照区とシアナミド処理区の泳動パターンは類似しており、それぞれのゲルで約300個のスポットが確認された(第4.1図)。4区を比較したところ、pI約4.9・M.W.約32 kDa, pI約5.0・M.W.約30 kDa, pI約5.2・M.W.約30 kDaの3つのスポットは、4区間で形状および濃さに違いがみられた(第4.2図)。また、12月24日の対照区では確認されなかったpI約5.4・M.W.約24 kDaのスポットが12月24日のシアナミド処理区および2月16日の両処理区で確認された(第4.3図)。

第4.3表 シアナミド処理による‘ゴールド二十世紀’の萌芽率の変化

処理区	萌芽率 (%) ^Z	
	12月24日	2月16日
対照区	0.0 b ^Y	54.0 b
シアナミド処理区	80.0 a	84.0 a

^Z23°Cで水挿し加温処理し28日後に調査

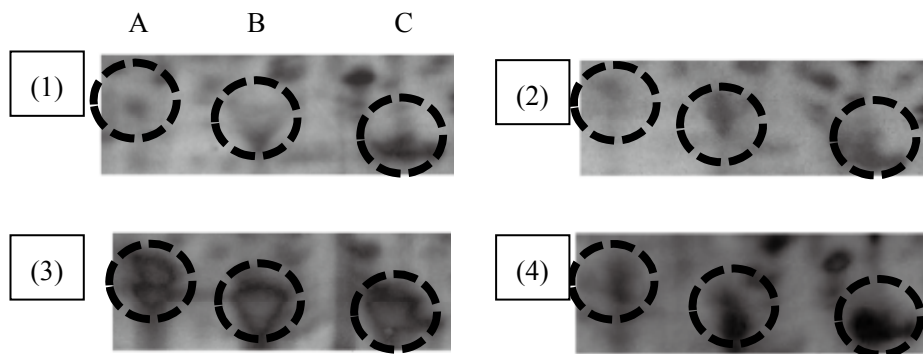
^Y同列内の異なる英文字は χ^2 検定において5%水準で有意差あり



第 4.1 図 ‘ゴールド二十世紀’ 葉芽のタンパク質の二次元電気泳動像

(1) : 12 月 24 日の対照区, (2) : 2 月 16 日の対照区

(3) : 12 月 24 日のシアナミド処理区, (4) : 2 月 16 日のシアナミド処理区

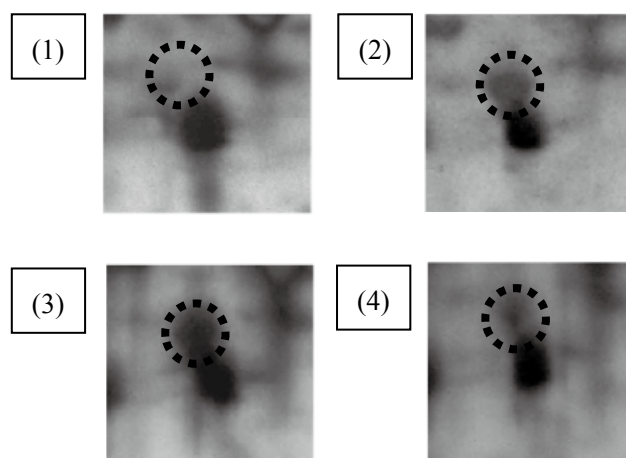


第 4.2 図 タンパク質の二次元電気泳動像：スポット A, B, C

(pI 約 4.9~5.2・M.W. 約 30~32 kDa)

(1) : 12 月 24 日の対照区, (2) : 2 月 16 日の対照区

(3) : 12 月 24 日のシアナミド処理区, (4) : 2 月 16 日のシアナミド処理区



第 4.3 図 タンパク質の二次元電気泳動像：スポット D

(pI 約 5.4・M.W. 約 24 kDa)

(1) : 12 月 24 日の対照区, (2) : 2 月 16 日の対照区

(3) : 12 月 24 日のシアナミド処理区, (4) : 2 月 16 日のシアナミド処理区

第3節 MALDI-TOF-MSによる質量分析

前節の二次元電気泳動により、低温積算およびシアナミド処理に伴い葉芽中のタンパク質に変化が生じることが確認された。その中でも、4区間で形状および濃さに違いがみられた4つのスポットは、自発休眠打破に関与するタンパク質であると考えられた。これらのスポットのアミノ酸配列を決定することで、各スポットのタンパク質を同定することが可能となる。

アミノ酸配列を決めるプロテインシーケンサーは、アミノ酸をN末端から一つずつ切り出すエドマン分解法によって解析されるが、修飾されたN末端では反応が起きないという欠点があり同定には困難を極める。一方、同定されたタンパク質のデータベース化が進んでいるモデル植物等では、二次元電気泳動のpI値および分子量からタンパク質を推定することも可能となっている。しかしながら、様々な修飾をうけるタンパク質をスポットの位置から決定することは難しい。

近年、タンパク質を同定する方法として主流となっているのは、質量分析装置を用いた解析法である。この方法では、タンパク質をプロテアーゼで消化し、質量分析装置で得られたペプチドマスフィンガープリント (PMF) 等の情報をデータベースで検索し同定するボトムアップ方式で解析する。この手法は、ほとんどのタンパク質に適用でき、汎用性という点で現在のプロテオーム解析法を中心となっている。

本節では、前節で注目した4つのスポットについてMALDI-TOF-MS質量分析装置で解析し、PMF法によるタンパク質の同定を試みた。

材料および方法

実験には、前節で抽出した 2009 年 12 月 24 日のシアナミド処理区の葉芽のタンパク質を用いた。前節と同様の方法で二次元電気泳動を行った後、Shevchenko ら (1996) の方法に従い、グルタルアルデヒド処理を行わない質量分析用の銀染色法でゲルを染色した。

< ゲルの脱色 >

染色後のゲルから、前節でシアナミド処理後に変化の確認された 4 つのスポットを切り出し、ゲル片をエッペンチューブに移した。その後、100 μ L の脱色液 (15 mM フェリシアン化カリウム, 50 mM チオ硫酸ナトリウム) を加え、室温で 10 分間振とうした。脱色液を取り除いた後、滅菌水を 500 μ L 加えて室温で 15 分振とうするゲル片の洗浄を 3 回行った。

< ゲル内消化 >

ゲル内消化は、Gharahdaghi ら (1999) の方法に従い行った。アセトニトリルを 100 μ L 加え室温で 5 分間振とうした後、ゲル片を乾燥させた。乾燥後のゲルに還元液 (10 mM DTT, 25 mM 重炭酸アンモニウム) を 100 μ L 加えて 56°C で 1 時間振とうした後、還元液を取り除き洗浄バッファー (25 mM 重炭酸アンモニウム) を 100 μ L 加え 10 分間振とうした。振とう後、アルキル化液 (55 mM ヨードアセトアミド, 25 mM 重炭酸アンモニウム) を 100 μ L 加え、遮光して室温で 45 分間振とうした。反応後のアルキル化液を取り除き、洗浄バッファーを 100 μ L 加え、10 分間振とうした後、脱水液 (50% アセトニトリル, 25 mM 重炭酸アンモニウム) を 200 μ L 加え、室温で 10 分間振とうした。脱水操作を 3 回行い、ゲルを乾燥させた後、トリプシン溶液 (10 μ g / ml, 50 mM 重炭酸アンモニウム)

を加え、30 分間氷上で放置した。その後、余分なトリプシン溶液を取り除き、37°C で一晩反応させた。トリプシン処理後のゲルに抽出液（50%アセトニトリル、5%トリフルオロ酢酸）を 50 μ L 加えて室温で 30 分間振とうした後、抽出液を回収した。さらに 25 μ L の抽出液を加え、室温で 30 分間振とうした後の抽出液も回収し、2 回の抽出液を合わせた。抽出液は減圧遠心機で約 10 μ L まで濃縮した。濃縮液は ZipTip (Millipore) で脱塩した後、マトリックス溶液（5 mg / ml CHCA（ α -シア-4-ヒドロキシケイヒ酸）in 50% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸）で溶出し、MALDI-TOF MS 用の試料台上で乾燥・結晶化した。

< プロテインシーケンサーによるアミノ酸配列の決定 >

ゲル内消化の過程で、トリプシン処理を行わず抽出液によりゲルから抽出した溶液を分析サンプルとし、プロテインシーケンサー PPSQ-31A (SHIMADZU) を用いアミノ酸配列の決定を行った。

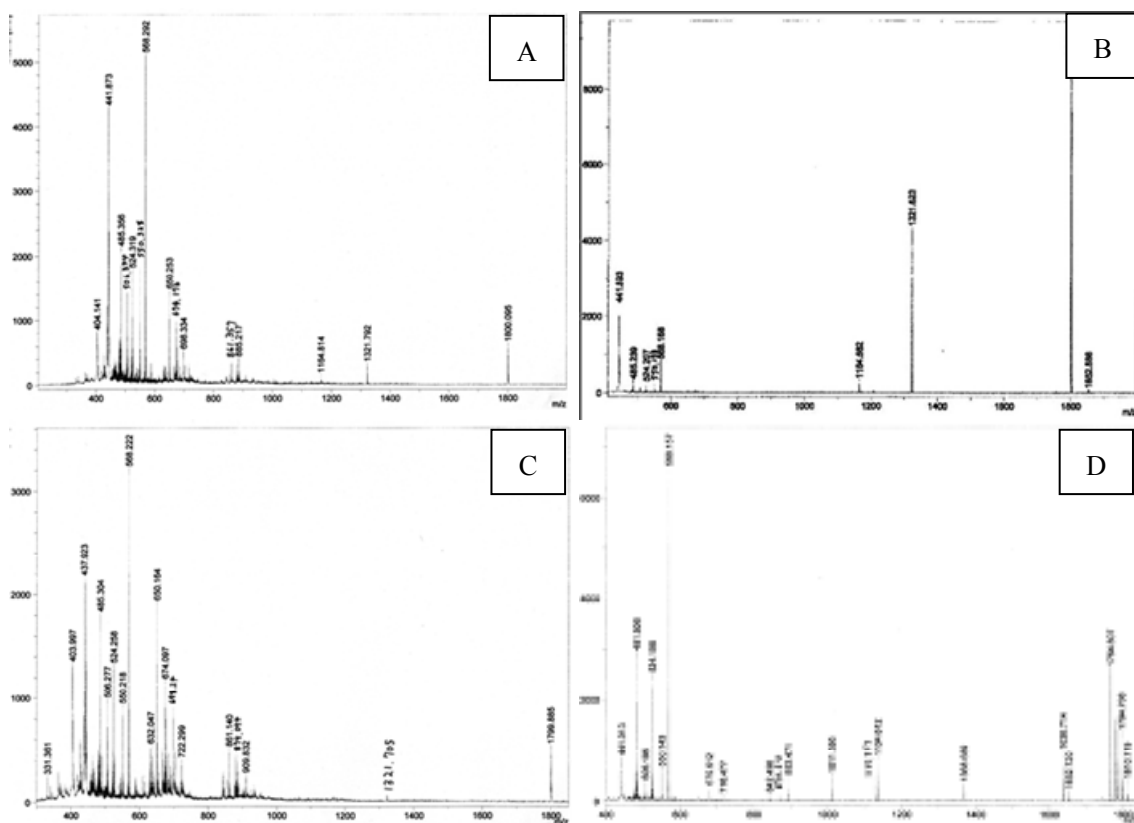
< MALDI-TOF-MS による質量分析 >

質量分析には、MALDI-TOF-MS 装置 AutoFLEX-2 (BRUKER) を用い、測定はリフレクトモードで行った。また、得られたスペクトルは Mascot で解析し、検索には Swiss-Prot のデータベースを使用した。

結果

前節で注目した A, B, C, D の 4 つのスポットをプロテインシーケンサーで解析したが、4 スポットとも N 末端の修飾が確認され同定には至らなかった。

トリプシン処理後の MALDI-TOF MS による質量分析の結果、各スポットにおけるスペクトルが第 4.4 図のように示された。これらのスペクトルを Mascot で解析し相同性検索を行った結果、第 4.4 表に示されるタンパク質との部分的な相同性が推測された。



第 4.4 図 MALDI-TOF MS により得られたスペクトル

第 4.4 表 Swiss-Prot による相同性検索の結果

スポット	pI 値	M.W. (kDa)	相同性タンパク質	E 値
A	4.9	32	20 kDa chaperonin (<i>Pisum sativum</i>)	1.5e ⁺⁰²
			GTP-binding protein yptV2 (<i>Volvox carteri</i>)	1.3e ⁺⁰³
			Lactose-binding lectin-2 (<i>Cymbosema roseum</i>)	1.5e ⁺⁰³
B	5.0	30	Peptide methionine sulfoxide reductase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	79
			Violaxanthin de-epoxidase (<i>Nicotiana tabacum</i>)	3.9e ⁺⁰²
			Chaperonin CPN60 (<i>Brassica napus</i>)	5.6e ⁺⁰²
C	5.2	30	NAD(P)H-quinone oxidoreductase (<i>Cycas taitungensis</i>)	2.0e ⁺⁰²
			Protein PR-L1 (<i>Lupinus luteus</i>)	3.1e ⁺⁰²
			Non-specific lipid-transfer protein P1 (<i>Vitis</i> sp.)	5.0e ⁺⁰²
D	5.4	24	60S ribosomal protein L12 (<i>Prunus armeniaca</i>)	42
			50S ribosomal protein L2 (<i>Anthoceros formosae</i>)	6.9e ⁺⁰²
			Non-specific lipid-transfer protein (<i>Musa acuminata</i>)	8.7e ⁺⁰²

※各スポットとも、E 値の高い順に 3 番目までを示す。

第4節 nLC-ESI-MS/MS による質量分析

前節では、MALDI-TOF-MS を用いた PMS 法により二次元電気泳動で分離したスポットのタンパク質の同定を試みた。しかしながら E 値の低さからも、これらの相同性検索の結果のみでは、タンパク質を同定することが不十分であると考えられた。

質量分析法を利用したタンパク質の同定法には、PMS 法と配列タグ法がある。PMF 法は、トリプシンなどのプロテアーゼで配列特異的に断片化して生じたペプチドの質量セットに基づいてタンパク質を同定する方法で、ゲル電気泳動法や LC 法で分離精製した比較的均一なタンパク質の同定に用いられる。一方、配列タグ法は、タンパク質のプロテアーゼ消化で生じた特定のペプチドの質量（プロテアーゼの基質特異性を考慮して解釈される）と衝突誘起解離法などで生じた断片イオンの質量セットからタンパク質を同定する方法である。この方法は、タンパク質複合体を混合物のままプロテアーゼで消化し、生成したペプチド混合物を LC で分離しながらオンラインで質量分析計に導入して、配列タグ法でタンパク質を同定する方法で、「ショットガン法」とも呼ばれる LC-MS 法である。この方法では、等電点や水溶性などの物理化学的な性質に関わらず、試料中の多くのタンパク質を一度に同定することが可能である。

本節では、前節で採取した 4 区間の葉芽を SDS-PAGE で分離した後、各区で発現しているタンパク質を同定し、自発休眠期に発現しているタンパク質を網羅的に同定した。さらに、各区で同定されたタンパク質を比較することで、自発休眠の最深期および打破時に特異的に発現するタンパク質が存在するかを調査した。

材料および方法

実験には、前節で抽出した 2009 年 12 月 24 日および 2010 年 2 月 16 日の対照区とシアナミド処理区の葉芽のタンパク質を用いた。

< タンパク質の一次元電気泳動 >

Laemmli (1970) の方法に従い、14%ポリアクリルアミドゲルによる SDS-PAGE を行った。抽出後のタンパク質試料に、等量の 2×サンプルバッファー (0.125M Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-メルカプトエタノール, 4% SDS, 10%スクロース, 0.004% ブロモフェノールブルー) を加えて攪拌し、沸騰した水浴中で 3 分間ボイルしたものを泳動用サンプルとした。ゲルを作成後、スラブ型電気泳動装置 (AE-6200, アトー社) を用い、30 mA で 4 時間の電気泳動を行った。その後、泳動終了後のゲルは CBB (Coomassie brilliant blue) で染色した。

< ゲルの脱色およびゲル内消化 >

染色後のゲルはレーンごとに切り分け、さらにそれぞれのレーンを分子量マーカーのサイズに合わせて細分した。細分したゲルをエッペンチューブに移した後、100 μ L の脱色液 (50%アセトニトリル, 25 mM 重炭酸アンモニウム) を加え、室温で 10 分間振とうし脱色液を取り除いた。ゲル片から青い色が完全に抜けるまで脱色を繰り返し、前節と同様の方法でゲル内消化を行った。

< nLC-ESI-MS/MS による質量分析 >

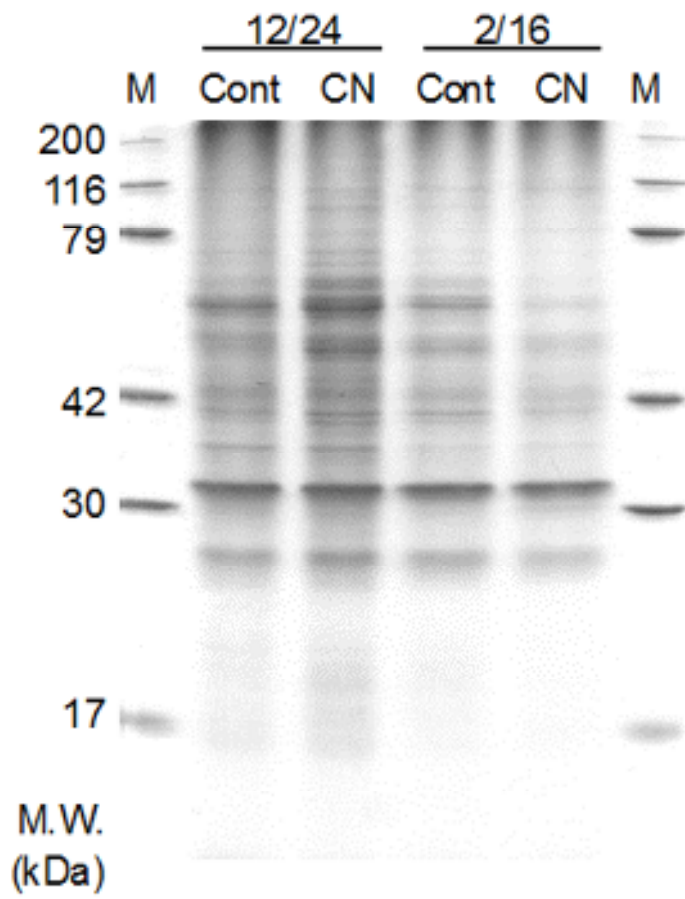
質量分析は、nLC-ESI-MS/MS 型質量分析装置 (Triple Quad™ 5500 System, AB SCIEX) を用いて行った。その後、ProteinPilot™ Software (AB SCIEX) を用いてタンパク質の相同性検索を行った。

結果

CBB 染色後の泳動像を第 4.5 図に示した。一次元 SDS-PAGE の結果、全処理区において類似したバンドパターンが得られたが、12 月 24 日の両処理区に比べ 2 月 16 日の両処理区でバンドの濃さが薄くなる M.W. 約 60 kDa のバンドが確認された。

一次元 SDS-PAGE 後のゲルから 12 月 24 日における M.W. 約 20~79 kDa の範囲を切り出し、タンパク質の質量分析を行ったところ、対照区とシアナミド処理区の間で共通して同定されたタンパク質は 78 個であった（第 4.5 表、第 4.6 表）。その中の 38 個は酵素として確認され、酸化還元酵素の割合が 41% と最も多かった（第 4.6 図）。一方、対照区でのみ同定されたタンパク質は 4 個、シアナミド処理区のみで同定されたタンパク質は 9 個であった（第 4.7 表）。

また、12 月 24 日および 2 月 16 日の M.W. 約 42~79 kDa のタンパク質について比較した結果、両日で共通して同定されたタンパク質が 34 個あり（第 4.8 表）、そのうちの 24 個が酵素として確認された。同定されたタンパク質のうち、12 月 24 日のみで同定されたタンパク質は 2 個あり（第 4.9 表）、そのなかの L-ascorbate peroxidase 1 は対照区のみで確認された。一方、2 月 16 日のみで同定されたタンパク質は 0 個であった。



第 4.5 図 ‘ゴールド二十世紀’ 葉芽のタンパク質の一次元電気泳動像

Cont : 対照区 CN : シアナミド処理区 M : 分子量マーカー

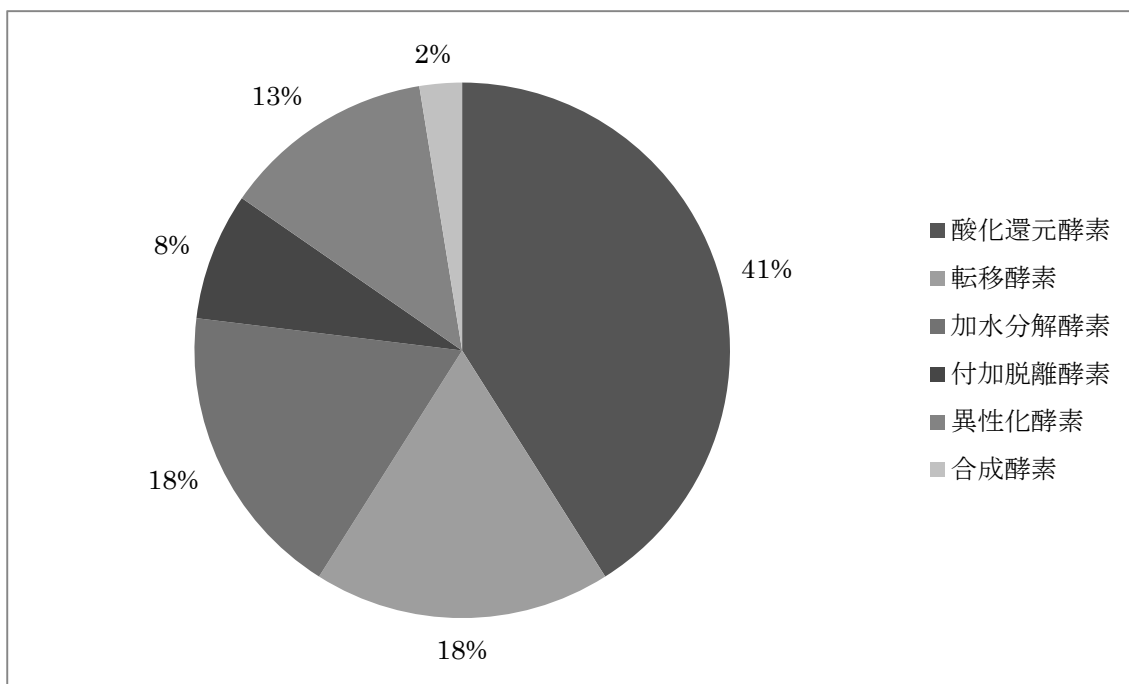
第 4.5 表 12 月 24 日の両処理区間で共通して同定された構造タンパク質

(M.W. 約 20~79 kDa)

タンパク質	学名
14-3-3-like protein	<i>Lilium longiflorum</i>
17.6 kDa class I heat shock protein	<i>Helianthus annuus</i>
18.1 kDa class I heat shock protein	<i>Pisum sativum</i>
20 kDa chaperonin, chloroplastic	<i>Spinacia oleracea</i>
40S ribosomal protein S3-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>
60 kDa chaperonin	<i>Bacteroides forsythus</i>
60S acidic ribosomal protein P0-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>
60S ribosomal protein L12	<i>Prunus armeniaca</i>
Actin-7	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial	<i>Triticum aestivum</i>
Calreticulin	<i>Prunus armeniaca</i>
CBS domain-containing protein CBSX3, mitochondrial	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Cysteine proteinase inhibitor 12	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
Dehydrin ERD14	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Dicer-like protein 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Elongation factor 1-alpha	<i>Puccinia graminis</i>
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	<i>Medicago sativa</i>
Expansin-A7	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
Glutathione S-transferase DHAR2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
GTP-binding nuclear protein Ran-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Heat shock 70 kDa protein	<i>Zea mays</i>
Histone H2B.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Luminal-binding protein 5	<i>Nicotiana tabacum</i>
Major allergen Mal d 1	<i>Malus domestica</i>
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Polyubiquitin 12	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Polyubiquitin 8	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Proteasome subunit alpha type-7	<i>Solanum lycopersicum</i>
Proteasome subunit beta type-6	<i>Nicotiana tabacum</i>
Putative tail sheath protein	<i>Haemophilus phage</i>
Ras-related protein RABD2c	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	<i>Geranium grandiflorum</i>
RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	<i>Pisum sativum</i>
Thaumatococin-like protein 1b (Fragment)	<i>Malus domestica</i>
Translationally-controlled tumor protein homolog	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
Tubulin beta-1 chain	<i>Glycine max</i>
Uncharacterized protein At2g37660, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>

第 4.6 表 12 月 24 日の両処理区間で共通して同定された機能性タンパク質
(M.W. 約 20~79 kDa)

タンパク質	学名
2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Adenosylhomocysteinase 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Adenylate kinase A	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]	<i>Pisum sativum</i>
Aspartate aminotransferase, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP synthase subunit beta, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Cytochrome c oxidase subunit 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	<i>Pisum sativum</i>
Enolase	<i>Petunia hybrida</i>
Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
GDSL esterase/lipase APG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Glutamine synthetase root isozyme 5	<i>Zea mays</i>
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	<i>Petunia hybrida</i>
Isoflavone reductase homolog	<i>Solanum tuberosum</i>
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	<i>Zea mays</i>
Malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Citrullus lanatus</i>
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Peroxidase 7 (Fragment)	<i>Cycas revoluta</i>
Peroxiredoxin-2B	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Phosphoglucomutase, cytoplasmic	<i>Pisum sativum</i>
Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	<i>Triticum aestivum</i>
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 1, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Polyphenol oxidase, chloroplastic	<i>Vitis vinifera</i>
Probable fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Probable protein phosphatase 2C 59	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Protein disulfide isomerase-like 2-1	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
Protein disulfide-isomerase	<i>Datisca glomerata</i>
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	<i>Arabidopsis thaliana</i>
S-adenosylmethionine synthase 2	<i>Elaeagnus umbellata</i>
Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic	<i>Medicago sativa</i>
Transaldolase (Fragments)	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>
Triosephosphate isomerase, chloroplastic	<i>Fragaria ananassa</i>
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>Pyrus pyrifolia</i>
V-type ATP synthase beta chain	<i>Dictyoglomus turgidum</i>
V-type proton ATPase subunit E	<i>Citrus limon</i>



第 4.6 図 12 月 24 日の両処理区間で共通して同定された酵素の種類別割合 (M.W. 約 20~79 kDa)

第 4.7 表 12 月 24 日の対照区およびシアナミド処理区で特異的に同定されたタンパク質 (M.W. 約 20~79 kDa)

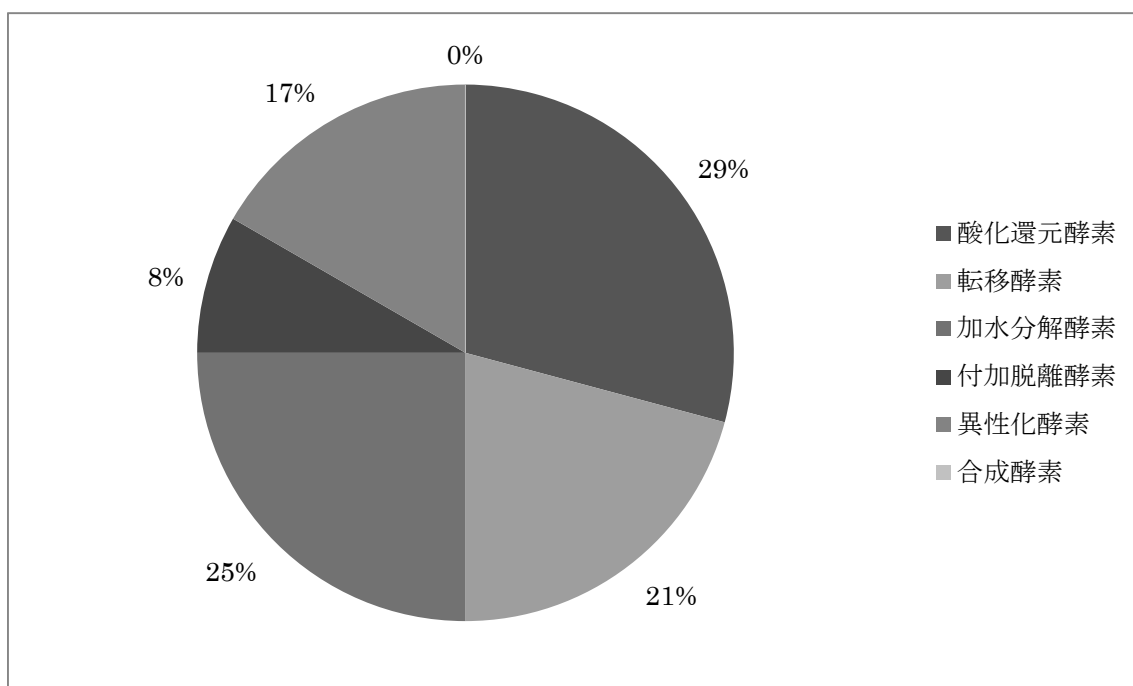
処理区	タンパク質	学名
対照区	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Neutral ceramidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Methionine import ATP-binding protein MetN	<i>Nocardia farcinica</i>
	T-box-containing protein 2	<i>Halocynthia roretzi</i>
シアナミド処理区	3-ketoacyl-CoA thiolase 1, peroxisomal	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Alcohol dehydrogenase 2	<i>Solanum lycopersicum</i>
	Chloroplast envelope membrane 70 kDa heat shock-related protein	<i>Spinacia oleracea</i>
	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic (Fragment)	<i>Medicago sativa</i>
	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1, chloroplastic	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
	Probable fructokinase-4	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Pup-protein ligase	<i>Micrococcus luteus</i>
	Pyruvate decarboxylase isozyme 2	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 2, mitochondrion	<i>Arabidopsis thaliana</i>	

第 4.8 表 12 月 24 日および 2 月 16 日で共通して同定されたタンパク質

(M.W. 約 42~79 kDa)

タンパク質	学名
Actin-2	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Indica</i>
Calreticulin	<i>Prunus armeniaca</i>
Chloroplast envelope membrane 70 kDa heat shock-related protein	<i>Spinacia oleracea</i>
Dehydrin ERD14	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Elongation factor 1-alpha	<i>Spinacia oleracea</i>
Heat shock 70 kDa protein	<i>Zea mays</i>
Luminal-binding protein 5	<i>Nicotiana tabacum</i>
RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	<i>Pisum sativum</i>
Tubulin beta-1 chain	<i>Glycine max</i>
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	<i>Ricinus communis</i>
3-ketoacyl-CoA thiolase 1, peroxisomal	<i>Arabidopsis thaliana</i>
26S protease regulatory subunit 7 homolog A	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Adenosylhomocysteinase 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Alcohol dehydrogenase class-P	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	<i>Pisum sativum</i>
Enolase	<i>Ricinus communis</i>
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	<i>Taxus baccata</i>
Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic (Fragment)	<i>Medicago sativa</i>
Leucine aminopeptidase 3, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Catharanthus roseus</i>
Peroxidase 15	<i>Ipomoea batatas</i>
Phosphoglucomutase, cytoplasmic	<i>Solanum tuberosum</i>
Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	<i>Triticum aestivum</i>
Polyphenol oxidase, chloroplastic	<i>Vitis vinifera</i>
Protein disulfide-isomerase	<i>Medicago sativa</i>
Pyruvate decarboxylase isozyme 2	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>
Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	<i>Averrhoa carambola</i>
S-adenosylmethionine synthase 2	<i>Elaeagnus umbellata</i>
Transaldolase (Fragments)	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>Pyrus pyrifolia</i>
V-type proton ATPase catalytic subunit A	<i>Arabidopsis thaliana</i>

※表中の上記は構造タンパク質，下記は機能性タンパク質を示す



第 4.7 図 12 月 24 日および 2 月 16 日で共通して同定された酵素の種類別割合
(M.W. 約 42~79 kDa)

第 4.9 表 12 月 24 日のみで特異的に同定されたタンパク質
(M.W. 約 42~79 kDa)

タンパク質	学名
L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1, chloroplastic	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>

第5節 考察

これまでの研究では、落葉果樹の芽の自発休眠の機構解明を目的とし、自発休眠の推移によって発現量が増減する遺伝子についての発現解析が行われてきた (Li ら, 2009 ; Mazzitelli ら, 2007 ; Ubi ら, 2010 ; Yamane ら, 2008). タンパク質の合成は遺伝子の転写によって起こっているが、分解が早かった場合や翻訳が効率的に行われなかった場合は、細胞内のタンパク質含量としては少なくなるため、遺伝子の発現レベルとタンパク質の含量とは比例していない。そのため、近年では、タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析が広く行われているが、果樹を用いた解析や自発休眠期における解析については研究事例が非常に少ない。

本章では、自発休眠最深期と打破期の対照区とシアナミド処理区の芽で発現しているタンパク質を比較し、質量分析法によりタンパク質の同定を行った。二次元電気泳動法で 4 区間を比較した結果、低温積算およびシアナミド処理に伴い葉芽中のタンパク質に変化が生じることが確認された。スポット A, B, C は 12 月 24 日および 2 月 16 日の両日において、対照区よりシアナミド処理区でスポットの濃さが濃くなり、これらのタンパク質はシアナミド処理により発現が誘導されたタンパク質であると推測された。さらに、各スポットを両処理日のシアナミド処理区間で比較したところ、スポット A および D は自発休眠打破期の 2 月 16 日に比べ最深期である 12 月 24 日の処理区でスポットが濃く、スポット B, C の形状は処理日によって異なっていた。黒木ら (2009) は、ニホンナシの芽の自発休眠打破に及ぼすシアナミド処理の影響を調査しており、対照区の萌芽率が高くなる打破期にシアナミド処理を行った際、萌芽を抑制する場合もあり、処理時期によりシアナミドの処理効果も異なると報告している。その

ため、これらのタンパク質の発現がシアナミド処理によって誘導され始める時間やその蓄積量は、自発休眠のステージによっても異なると考えられ、自発休眠の深度によってもシアナミドに対する感受性や生体反応もやや異なると推測された。これらのスポットは、自発休眠打破前に誘導されるタンパク質であると考えられたため、各スポットについて MALDI-TOF MS を用いた PMS 法によるタンパク質の同定を試みたが、高い相同性をもつタンパク質とは一致せず同定には至らなかった。

この要因としては、二次元電気泳動により分離されたスポットのタンパク質含量の少なさ等があげられるが、二次元電気泳動で確認されたタンパク質は酸性側に帯電する一部のタンパク質のみである。質量分析法を利用したタンパク質の同定法には PMS 法と配列タグ法があり、後者の方法では、等電点や水溶性などの物理化学的な性質に関わらず、試料中の多くのタンパク質を一度に同定することが可能である。本研究では 4 区間の葉芽を SDS-PAGE で分離し、各区で発現しているタンパク質を同定し、自発休眠期に発現しているタンパク質を網羅的に同定する配列タグ法での解析を行った。

その結果、約 20~79 kDa における 12 月 24 日の対照区とシアナミド処理区の両区間で 78 個の共通するタンパク質が同定され、M.W. 約 42~79 kDa における 12 月 24 日と 2 月 16 日の両日で 34 個の共通するタンパク質が同定された。その中には、ストレスで誘導される Dehydrin や Heat shock protein (HSP) が確認された。dehydrin 様タンパク質は、ウメの芽を用いたタンパク質の二次元電気泳動により、休眠期あるいは休眠覚醒期において発現の消長が確認されており (山根ら, 2003)、いくつかの HSP は低温によって誘導されることが知られている (Krishina ら, 1995)。さらに、前節で不凍性タンパク質である Thaumatin-like protein が自発休眠最深期から打破期にかけて発現量が低下する遺伝子として単

離されたが、本節ではタンパク質としても休眠芽内で同定された。

また、12月24日の両処理区間および12月24日と2月16日で共通して同定された酵素の種類別割合を算出した結果、どちらも酸化還元酵素の割合が最も高かった。自発休眠打破との関連性が示唆されている過酸化水素（Kuroda ら、2002）の消去系の酵素である Peroxidase は酸化還元酵素に分類され、自発休眠打破の生理的機構の解明を目的とした多くの研究が報告されている（Noriega ら、2007；Ben ら、2012）。さらに、アスコルビン酸を基質として過酸化水素を無毒化する L-ascorbate peroxidase 1 が、12月24日の対照区で特異的に同定された。Kuroda ら（2002）は、ニホンナシの芽の過酸化水素含量が自発休眠の打破直前まで増加することを確認している。自発休眠の最深期では過酸化水素が多く存在すると考えられ、それを分解する L-ascorbate peroxidase の含量が多くなったため、このタンパク質が特異的に単離されたと推測される。

本研究では、自発休眠期に実際に発現しているタンパク質を同定することに成功したが、芽の中での個々のタンパク質の含量については不明確である。今後はこれらの相対発現量を比較することで自発休眠打破の生理的機構の解明につながると考えられる。

第6節 摘要

ニホンナシの自発休眠打破機構の解明を目的として、自発休眠最深期と打破期の芽で発現しているタンパク質を比較し、質量分析法によりタンパク質の同定を行った。二次元電気泳動後のゲルを銀染色法で染色した結果、それぞれのゲルで約 300 個のスポットが確認され、4 区を比較したところ、pI 約 4.9・M.W. 約 32 kDa, pI 約 5.0・M.W. 約 30 kDa, pI 約 5.2・M.W. 約 30 kDa の 3 つのスポットは、4 区間で形状および濃さに違いがみられた。また、12 月 24 日の対照区では確認されなかった pI 約 5.4・M.W. 約 24 kDa のスポットが 12 月 24 日のシアナミド処理区および 2 月 16 日の両処理区で確認された。

一次元 SDS-PAGE 後のゲルを用いた質量分析の結果、78 個のタンパク質が 12 月 24 日の両処理区間で共通して同定された。その中の 38 個は酵素として確認され、酸化還元酵素の割合が 41%と最も多かった。また、12 月 24 日と 2 月 16 日の両日で共通して同定されたタンパク質は 34 個であった。一方、L-ascorbate peroxidase 1 は 4 処理区中の 12 月 24 日の対照区のみで同定された。

第5章 ニホンナシ系統 TH3 と少低温要求性 タイワンナシ横山の F₁ における自発休眠特性

第1節 緒言

前章までの実験を通し、ニホンナシの自発休眠導入機構の解明、導入と打破に関与する遺伝子の解析、自発休眠期で実際に発現するタンパク質の同定を行ってきた。また、多くのニホンナシ品種の低温要求量についても明らかにすることが出来た。さらに、この低温要求量に関する実験結果は、今後、ニホンナシ栽培を行ううえで現在より少ない低温要求性の品種を育成することも急務であることを示している。

第1章の調査により、野生種の中にはニホンナシより低温要求量の少ないナシがあると考えられたが、Tamura ら (2001) の調査では、チョウセンマメナシ (*P. fauriei* Schneid) の低温要求量が最も少なく、Chill Unite (CU) 400 であると報告されている。また、ニホンナシの主要品種の中で最も低温要求量が少ないとされている‘豊水’は、低温要求量が CU. 800 であるため、少低温要求性品種を育成するためには、これまでに用いられていない新たな育種素材が必要とされる。その候補として、第3章の実験でも用いた台湾の在来ナシである横山に着目し研究を進めている。横山は自発休眠に導入せず、自発休眠打破に必要な低温要求性を有していないと考えられている。しかし、横山は肉質が荒いことからこれまでニホンナシの育種素材として使用されておらず、自発休眠に導入するか否かについても確認されていない。

一方、モモ (*Prunus persica* L. Batsch) では自発休眠に導入しない‘Evergreen’

peachを用いての研究が進んでいる。Rodriguezら（1994）は、‘Evergreen’ peachと自発休眠に導入する品種間における後代の形質分離から、自発休眠導入に関与する遺伝子は劣性遺伝子であると結論付けている。その調査にはF₁およびF₂系統群を用いているが、多くのバラ科落葉果樹は自家不和合性であるため自家結実により後代を得ることが困難である。そのような中でニホンナシでは、‘おき二十世紀’において自家和合性遺伝子S₄smの存在が確認されており、S₄sm遺伝子を保有することで自家和合性の形質を示すことが確認されている（佐藤ら、1988）。

これまでの自発休眠導入に着目した研究に加え、近年は固有の低温要求量を決定する量的遺伝形質についても研究が行われている。アンズ(*Prunus armeniaca* L.)では多低温要求性品種と少低温要求性品種の後代を少低温要求性品種に戻し交雑し、QTL解析を行った結果、低温要求量に関与する量的形質遺伝子座(QTL)が存在すると考えられている(Campoyら、2011)。類似した研究はリンゴ(*Malus domestica* Borkh)でも行われているが(van Dykら、2010)、ナシではQTL解析を行うための基礎となるF₁系統の自発休眠特性についても知見がない。

本研究では、少低温性品種育成のための基礎的知見を得るため、横山の自発休眠特性について調査した。同時に、我々がこれまでに横山を花粉親、ニホンナシ系統 TH3 を種子親として育成した F₁ 系統群の自発休眠期の萌芽率の分離についても調査を行い、本 F₁ 系統群が少低温性ニホンナシ品種育成のための中間母本として利用できるか否かについても調査を行った。また、TH3 は ‘おき二十世紀’の自殖により育成された系統であり、自家和合性遺伝子 S₄sm をホモでもつことが確認されている。そこで、これら F₁ 個体の自家和合性遺伝子 S₄sm 保有についても判定を行った。

第2節 台湾在来ナシ横山の自発休眠特性の調査および ニホンナシ系統TH3と横山のF₁系統の育成

第3章の結果から、台湾ナシ横山はニホンナシ品種の自発休眠導入期である鳥取の11月中旬から12月中旬にかけても萌芽率の低下が確認されなかった。また、第1章で行った萌芽率の調査の結果からも、同時期にこのような高い萌芽率を示すニホンナシ品種はみられず、野生種について同様に確認されていない。そのため、横山は自発休眠に導入しない、もしくは低温要求量が著しく少ないナシであると推測され、少低温要求性ニホンナシ品種を育成するうえで重要な育種素材になると期待される。しかしながら、横山の萌芽率の調査は、ニホンナシの自発休眠導入期である11月から12月までしか行っていないため、横山の導入期が著しく遅いのではないかという推測を否定することは出来ない。

そこで本節では、11月下旬から1月上旬までに採取した1年枝の萌芽率の調査を通し、横山の自発休眠特性について明らかにした。同時に、少低温要求性ニホンナシ品種を育成するためのニホンナシ系統TH3と横山のF₁の育成についても述べる。

材料および方法

実験には鳥取大学農学部附属農場に栽植されている10年生台湾在来ナシ横山と、対照となるニホンナシとして12年生‘ゴールド二十世紀’および33年生‘幸水’各1樹を供試した。自発休眠の深度を調査するため、2007年11月22日、12月1日、12月22日および2008年1月5日に各品種の発育枝を採取した。その後は、前章と同様の方法で萌芽率の調査を行った。

結果

全4回の調査日において横山の萌芽率は60%以上であった(第5.1表)。一方, ‘ゴールド二十世紀’の11月22日の萌芽率は36%であり, 12月1日には8%に低下した。その後は12月22日に8%, 1月5日には12%となり, 11月下旬以降の調査日においては横山の萌芽率に比べ低い値を示した。また‘幸水’の萌芽率も, 全4回の調査日とも横山の萌芽率より低く, 11月22日は12%, 12月1日には4%, 12月22日と1月5日は0%であった。

< ニホンナシ系統TH3と台湾在来ナシ横山のF₁系統の育成 >

鳥取大学においては, 1979年に行った‘おさ二十世紀’ (S₂S₄sm) の自家授粉により自殖後代TH3を得ている。TH3の花粉を‘二十世紀’ (S₂S₄) および‘新水’ (S₄S₅) に交雑し結実率と完全種子含有率を調査した結果, TH3のS因子型はS₄smS₄smであると推定された。2003年にTH3を種子親, 台湾在来ナシ横山を花粉親として交雑を行い, 41個体のF₁系統を得た。

第5.1表 台湾在来ナシ横山, ニホンナシ ‘ゴールド二十世紀’ および ‘幸水’ の萌芽率の季節的变化

品 種	萌芽率 (%) ^Z			
	11月22日	12月1日	12月22日	1月5日
横 山	64.0 a ^Y	60.0 a	64.0 a	72.0 a
ゴールド二十世紀	36.0 a	8.0 b	8.0 b	12.0 b
幸 水	12.0 b	4.0 b	0.0 b	0.0 b

^Z23°C で水挿し加温処理し28日後に調査

^Y同列内の異なる英文字は χ^2 検定において5%水準で有意差あり

第3節 F₁系統群の倍数性，親子鑑定， S遺伝子の判定および自発休眠特性の調査

前節の結果から台湾ナシ横山は11月下旬～1月上旬までの調査期間内には自発休眠に導入しないことが明らかとなった。また，仮に調査期間前までに自発休眠に導入していたとしても，横山の低温要求量は既知のナシ属植物，品種に比べても著しく少なく，少低温要求性ニホンナシ品種を育成するうえでの貴重な育種素材になるものと考えられた。

現在，少低温要求性ニホンナシ品種の育成を目的とし，ニホンナシ系統 TH3 を種子親，台湾ナシ横山を花粉親とした F₁ 系統の育成についても並行して行っている。種子親として用いたニホンナシ系統 TH3 は前節で述べたように‘おさ二十世紀’の自家受粉によって得られた後代であり，自家和合性遺伝子 S_4^{sm} 遺伝子をホモにもつと推測される。そのため，全 F₁ 系統は S_4^{sm} 遺伝子を保有し，その対立遺伝子に S_1 および S_4 遺伝子のいずれかを保有しなければ，これら F₁ 系統が自家和合性であると証明される。一方，これら F₁ 系統群が少低温要求性ニホンナシ品種を育成するための中間母本になるのか否かを判断するためは，横山の有する少低温要求性の形質が F₁ 系統群にどのように遺伝するかを明確にしておく必要がある。

本節では，F₁ 系統群とその両親にあたる横山および TH3 の倍異数性を確認し，SSR マーカーを用いた F₁ 系統群の親子鑑定を行った。その後，F₁ 系統群とその両親にあたる横山および TH3 の萌芽率を3年間にわたり調査し，F₁ 系統群の自発休眠特性を明らかにした。同時に，F₁ 系統群と横山および TH3 の S 遺伝子型についても判定を行った。

材料および方法

実験には鳥取大学農学部附属農場に栽植されている前節の台湾在来ナシ横山, 19年生 TH3 樹および7年生 TH3 ×横山の F₁ 系統 41 樹を供試した.

< 倍数性の確認 >

横山, TH3 および F₁ 個体の倍数性はフローサイトメーター (プロイディーアナライザーPA 型, Partec) を用いて, 以下の方法で調査した. 二倍体の対照品種として '幸水' を用い, 各系統の幼葉を測定に用いた. まず, 幼葉を核抽出液 (Cystain UV Precise P, Partec) 中でカミソリを用いて裁断した後, 20 μm のナイロンメンブレンでろ過した. ろ液に 4'-6-dimido-2-phenylindole (DAPI) を加えた後, 前述のフローサイトメーターで相対蛍光強度を測定し, 倍数性を判別した.

< SSRマーカーを用いた親子鑑定 >

F₁ 個体の両親を確認するため, SSR マーカーによる親子鑑定を行った. 幼葉から改変 CTAB 法により抽出した全 DNA を鋳型として, Yamamoto ら (2002 a, b, c) および Sawamura ら (2004) が開発した 40 種類のプライマー対を用いて PCR 反応を行った. PCR 反応条件は, 94°C・5 分, 次いで 94°C・1 分, 55°C・1 分, 72°C・2 分のサイクルを 35 回行った後, 最後に 72°C・10 分の伸長反応を行った. 得られた増幅産物は QIAxcel (Qiagen) を用いて電気泳動を行い, 増幅断片長を比較した. ゲルカートリッジ, DNA サイズマーカーおよびアライメントマーカーには, それぞれ QIAxcel DNA Screening Kit (Qiagen), QX DNA Size Marker 50 bp - 800 bp (Qiagen), Alignment Marker 15 bp / 1 kb (Qiagen) を用いた.

< 自発休眠特性の調査 >

F₁ 個体の自発休眠の深度を調査するため 2008, 2009 および 2010 年度の計 3 年間 12 月 1 日, 12 月 22 日および 1 月 5 日に各樹の枝を採取した. その後は, 前節と同様の方法で萌芽率の調査を行った.

また, 横山の萌芽率と TH3 の萌芽率との平均値を閾値とし, F₁ 系統を閾値以下の個体と閾値以上の個体に分け, 分離比が単一遺伝子支配の期待値と合致するか否かを χ^2 検定により検定した.

< S 遺伝子型の判定 >

さらに F₁ 個体の S₄sm 遺伝子および S₄ 遺伝子の有無を PCR によって確認した. S₄sm 遺伝子の有無を確認するため, S 遺伝子型が明らかになっている ‘おさ二十世紀’ (S₂S₄sm) をポジティブコントロールとし, Okada ら (2008) の報告を基に SM-F (5'-TCGTCTTAGGGATTCCAATGC-3') プライマーおよび SM-R (5'-GCCTTAAGGGTTCATTGGGC-3') プライマーを用い PCR 反応を行った. また S₁ および S₄ 遺伝子の有無を確認するため, EMBL/GenBank の DQ515793 (S₁ RNase gene) および AB009385 (S₄ RNase gene) の配列を基に PF-1.4 (5'-GTTGTTTACGGTTCACGGTTTG-3') プライマーと PR-1.4 (5'-TGGGCTGTCATATTCCTATCTG-3') プライマーを作製した. ポジティブコントロールには ‘今村秋’ (S₁S₆) および ‘二十世紀’ (S₂S₄), ネガティブコントロールには ‘長十郎’ (S₂S₃) および ‘新雪’ (S₅S₆) を用いた. PCR 反応条件は, 94°C・2 分, 次いで 94°C・30 秒, 55°C・30 秒, 72°C・1 分のサイクルを 35 回行った後, 最後に 72°C・10 分の伸長反応を行った. また, 得られた増幅産物の配列は ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により確認した.

結果

< 倍数性の確認 >

倍数性はフローサイトメーターによる 2C ピーク値の比較から推定した。相対蛍光強度を測定した結果、‘幸水’では明確な一つのピークが確認された(データ略)。横山, TH3 および全 F₁ 個体においても‘幸水’とほぼ同じ位置に明確な一つのピークがみられ、本実験で調査した個体は全て二倍体であることが確認された。

< SSR マーカーを用いた親子鑑定 >

40 種類の SSR マーカーを用いて PCR 反応を行い、横山および TH3 の両者で増幅断片長の異なる 4 種類の SSR マーカーを選抜した。選抜した SSR マーカーを用いた PCR 反応の結果、F₁ 個体からは横山および TH3 で確認された両方のバンドが検出された(第 5.1 図)。

< 自発休眠特性の調査 >

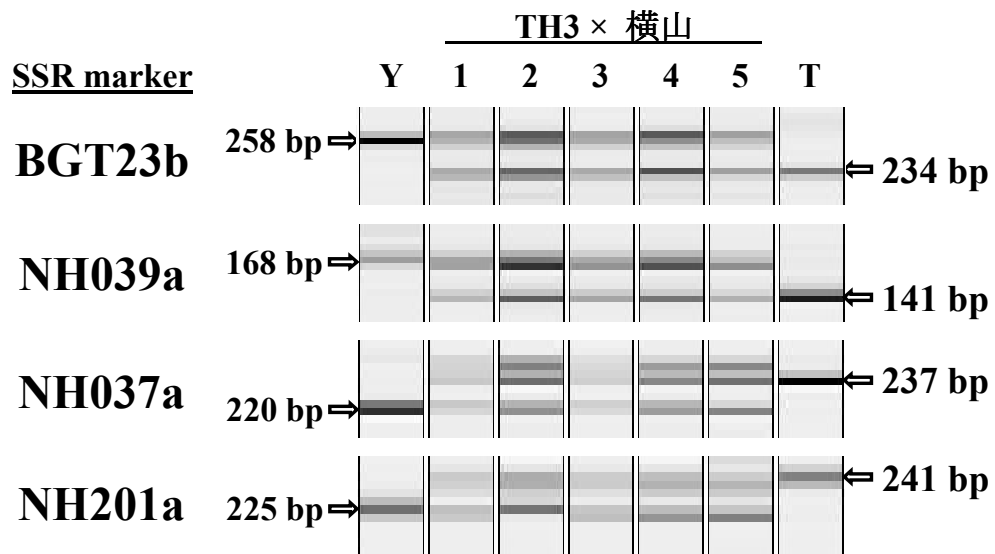
F₁ 系統群の萌芽率の度数分布を第 5.2 図に示した。2008, 2009 および 2010 年度の全調査日において横山の萌芽率は 60%以上であり、常に TH3 の萌芽率より高かった。2008 年度の TH3 の萌芽率は CU の積算に伴い 4, 27, 40%と徐々に上昇し、F₁ 系統群の萌芽率の平均値も上昇した。一方、2009 年 12 月 1~22 日にかけて TH3 の萌芽率は 20~8%に低下したが、F₁ 系統群の萌芽率の平均値は 20~43%に上昇した。その後の 1 月 5 日の TH3 の萌芽率は 10%と 2008 年度に比べて低く、F₁ 系統群の萌芽率の平均値は 24%であった。2010 年度の TH3 の萌芽率は CU の積算に伴い 23, 13, 46%と推移した。また 12 月 1 と 22 日における F₁

系統群の萌芽率の平均値はそれぞれ 33, 30%であったが, 1月5日には43%に上昇した.

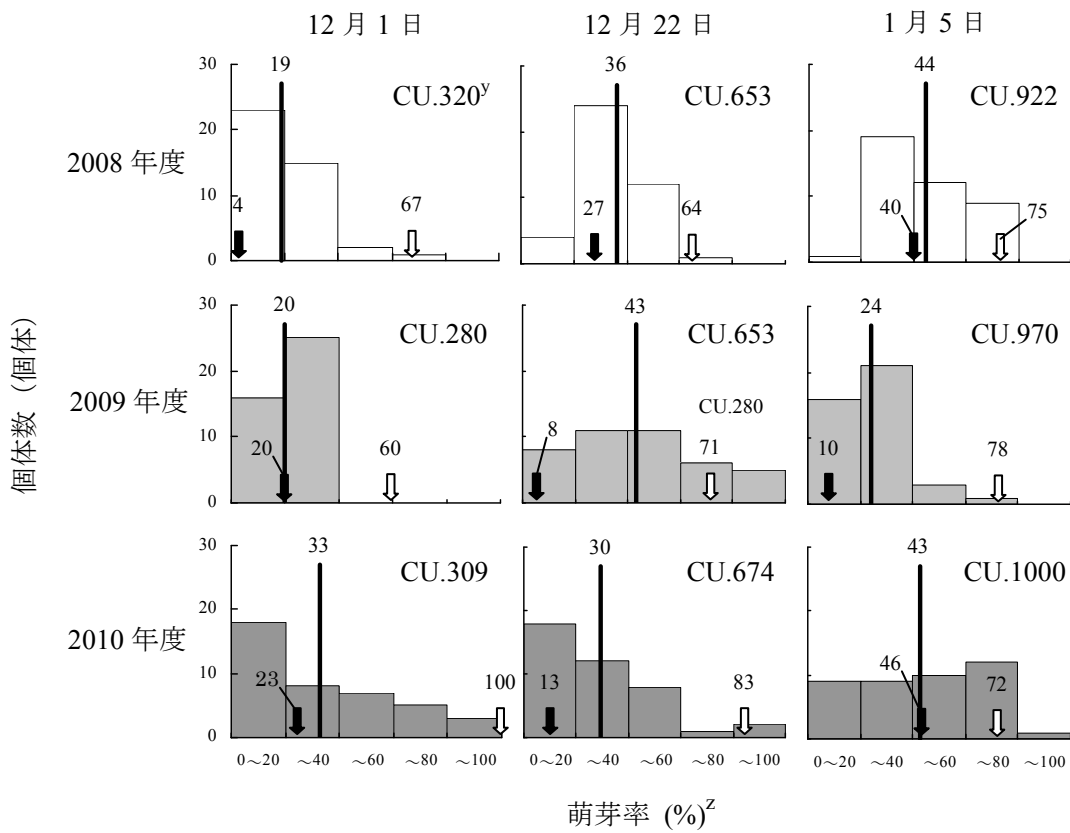
3か年にわたる調査結果から F₁ 系統群の萌芽率の平均値は, TH3 の萌芽率上昇に伴い上昇する傾向が見受けられた. そこで, TH3 が自発休眠の深度に關与する優性遺伝子をホモでもつと仮定し χ^2 検定を行ったが, 2009年度の12月22日と2010年度の1月5日の分離比は期待値と合致しなかった(第5.2表). さらに「閾値以下の個体と閾値以上の個体の分離比が3:1になる」という仮定では期待値と合致する調査日が2008年度の12月22日, 2008年度の1月5日および2010年度の1月5日のみであった.

< S遺伝子型の判定 >

S 遺伝子型の判定を行うため, PCR 反応液をアガロースゲル電気泳動により確認した. 約 670 bp の位置にある S₄sm 遺伝子のバンドは, 横山では確認出来なかったものの, TH3 および全 F₁ 個体では確認された(第5.3図). S₁, S₄ 遺伝子の判定を行った結果, S₁ 遺伝子を有する‘今村秋’と S₄ 遺伝子を有する‘二十世紀’からは約 300 bp の位置にバンドが確認された. また, これらの増幅断片の塩基配列を確認したところ, それぞれ S₁ および S₄ 遺伝子であることが確認され, 増幅断片長は 275 bp および 276 bp であった. 一方, S₁, S₄ 遺伝子のいずれも保有しない‘長十郎’および‘新雪’からは両バンドが検出されなかった. さらに, 横山, TH3 および全 F₁ 個体からもバンドは確認されなかった.



第 5.1 図 SSR マーカーを用いた TH3 × 横山の F₁ 個体の親子鑑定
 (QIAxcel による PCR 反応液の電気泳動)
 Y : 横山, 1~5 : F₁ 個体, T : TH3



第 5.2 図 TH3×横山の F₁ 個体の萌芽率の度数分布

^z 水挿し加温処理し 28 日後に調査

^y 調査日の低温積算量

図中の縦棒は F₁ 個体の萌芽率の平均値

↓, ↓ はそれぞれ TH3 と横山の萌芽率

第 5.2 表 TH3×横山の F₁ 個体の（萌芽率分布）多低温要求性遺伝子の
遺伝様式に関する χ^2 検定

調査日	多低温要求性 個体数 ^z	少低温要求性 個体数 ^y	χ^2 値 ^x	χ^2 値 ^w	
2008 年度	12 月 1 日	38	3	0.220	13.124**
	12 月 22 日	31	10	2.439	1.735
	1 月 5 日	31	10	2.439	1.735
2009 年度	12 月 1 日	41	0	0.000	21.259**
	12 月 22 日	16	25	15.243**	13.124**
	1 月 5 日	37	4	0.390	10.847**
2010 年度	12 月 1 日	33	8	1.561	3.905*
	12 月 22 日	34	7	1.195	5.314*
	1 月 5 日	28	13	4.122*	0.108

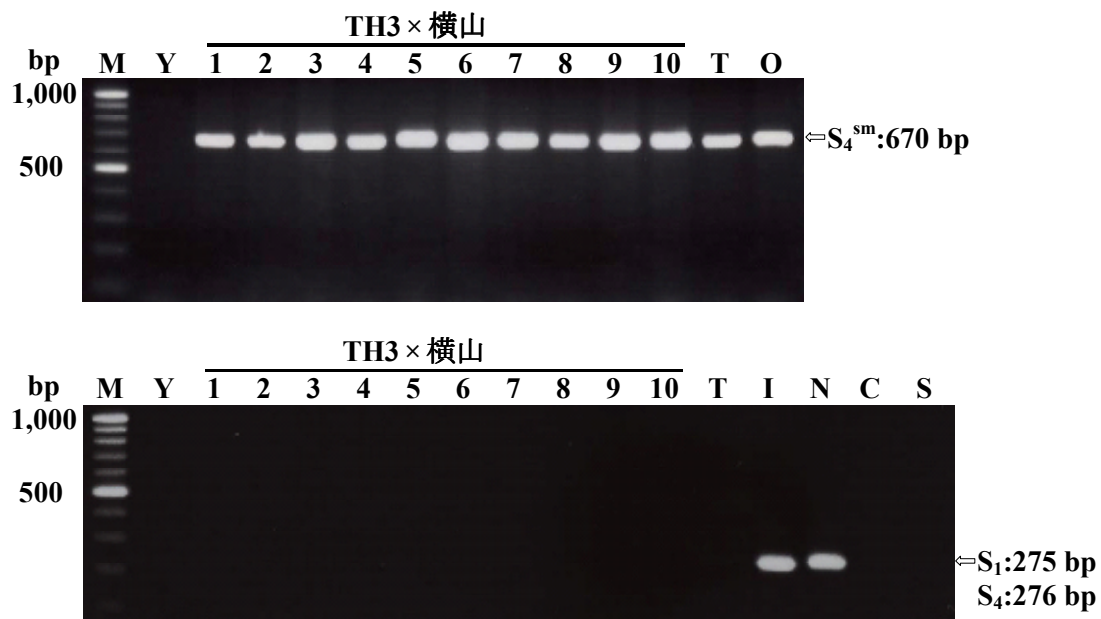
^zTH3 および‘横山’の萌芽率の平均を閾値とし、萌芽率が閾値以下の個体

^yTH3 および‘横山’の萌芽率の平均を閾値とし、萌芽率が閾値以上の個体

^xTH3 が多低温要求性に関する優性遺伝子をホモでもつ場合の期待値
(TH3:横山= 1:0) に対する χ^2 値

^w期待値 (TH3:横山= 3:1) に対する χ^2 値

*, ** はそれぞれ 5%または 1%水準で有意



第 5.3 図 TH3 × 横山の F_1 個体の S_4^{sm} および S_1, S_4 遺伝子有無の判定
 (A) S_4^{sm} 遺伝子有無の判定 (SM-F および SM-R プライマーを用いた PCR)
 (B) S_1, S_4 遺伝子有無の判定 (PF-1.4 および PR-1.4 プライマーを用いた PCR)
 Y : 横山, 1~10 : F_1 個体, T : TH3,
 O : ‘おさ二十世紀’ ($S_2 S_4^{sm}$),
 I : ‘今村秋’ ($S_1 S_6$), N : ‘二十世紀’ ($S_2 S_4$),
 C : ‘長十郎’ ($S_2 S_3$), S : ‘新雪’ ($S_5 S_6$),
 M : DNA マーカー

第4節 F₁系統群の落葉期および展葉期の調査

前節の結果から、横山、TH3 および全 F₁ 個体は全て二倍体であり、F₁ 個体の両親が横山と TH3 であること、全 F₁ 個体が自家和合性であることも確認された。また、F₁ 個体が示す萌芽率は横山と TH3 の萌芽率の間に広く分布し、F₁ 系統群の萌芽率の平均値は TH3 の萌芽率上昇に伴い上昇する傾向が見受けられた。そこで、TH3 が自発休眠の深度に関与する優性遺伝子をホモでもつと仮定し χ^2 検定を行ったが、この仮定は棄却され、低温要求量を決める遺伝要因には QTL が存在すると考えられた。

一方、自発休眠導入前の落葉と打破後の展葉については、F₁ 個体が両親のどちらの形質をどのように受け継いでいるかは不明である。また、ニホンナシの落葉と自発休眠への導入との関連についても不明確であるが、ブドウサンショウでは落葉後の発芽所要日数が急激に増加し自発休眠の深度が深くなると報告されている（前田ら、2007）。そのため、個体ごとに自発休眠の深度が異なった F₁ 個体の展葉期を調査することで、自発休眠打破とその後の展葉との関係についても明確になると考えられる。そこで本節では、横山、TH3 および F₁ 系統群の落葉期と展葉期の調査を行った。

材料および方法

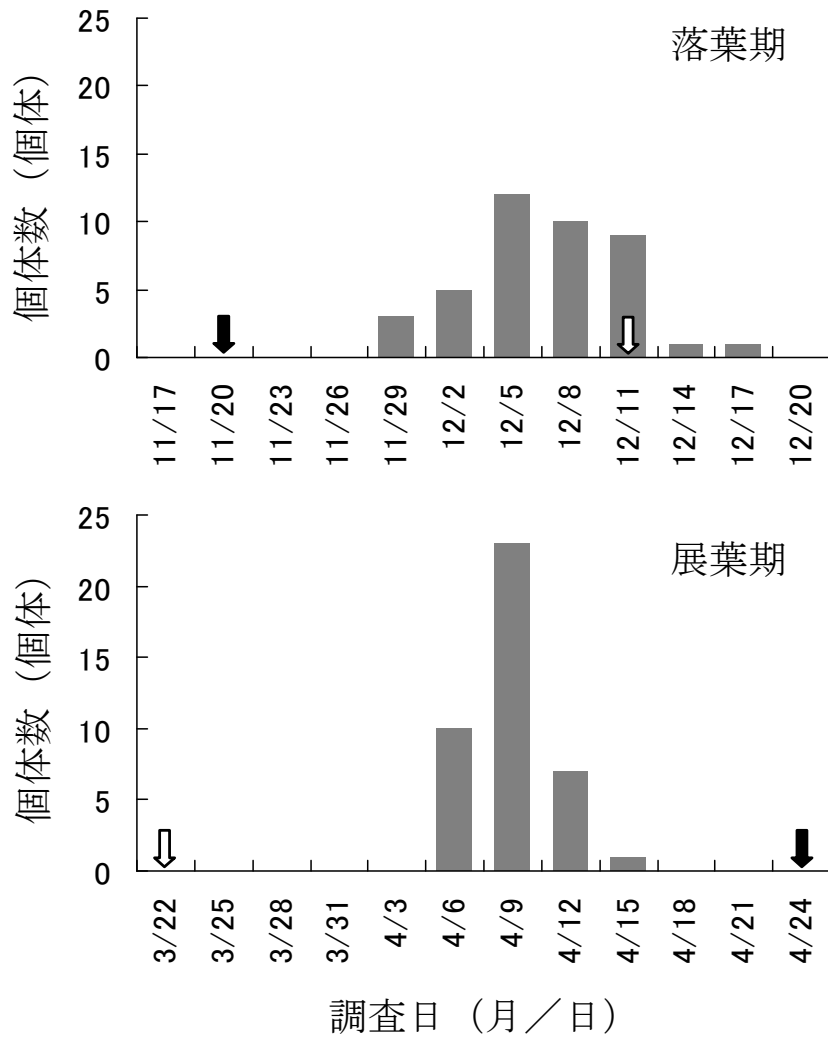
F₁ 個体の落葉期を調査するため、2010 年 11 月上旬～12 月下旬まで 3 日毎に横山、TH3 および F₁ 系統 41 個体の葉数を調査した。落葉期は樹の 70～80%の葉が落葉した時期（農林水産省果樹試験場、1994）とした。

また F₁ 個体の展葉期を調査するため、2011 年 3 月中旬～4 月下旬まで 3 日おきに横山、TH3 および F₁ 系統 41 個体の発芽した葉を調査した。展葉期は最初に発芽した葉の巻き込みが認められなくなった日とした。

結果

TH3 の落葉日は 11 月 20 日、横山は 12 月 11 日であった（第 5.4 図）。また、F₁ 系統群の落葉日は最も早い個体で 11 月 29 日、最も遅い個体で 12 月 17 日であったが、12 月 5 日に落葉日を迎える個体が最も多かった。

翌春の展葉日は横山が 3 月 22 日、TH3 は約 1 か月後の 4 月 24 日であった。また、F₁ 系統群の展葉日は 4 月 6 日に展葉する個体が最も早く、最も遅い個体は 4 月 15 日であったが、4 月 9 日に展葉日を迎える個体が最も多かった。



第 5.4 図 TH3×横山の F₁ 個体の落葉期および展葉期

(A) TH3×横山の F₁ 個体の落葉期

↓, ⇩ はそれぞれ TH3 と横山の落葉日

(B) TH3×横山の F₁ 個体の展葉期

↓, ⇩ はそれぞれ TH3 と横山の展葉日

第5節 考察

本章では、少低温要求性品種を育成するための基礎的知見を得る目的で、台湾在来ナシである横山、ニホンナシ系統 TH3 およびそれらの交雑により得られた F₁ 個体の自発休眠特性を明らかにした。

まず、横山が 11 月下旬～1 月上旬までの調査期間内には自発休眠に導入しないことを明らかにした（第 5.1 表）。一方、本調査のみでは、横山が調査開始日の 11 月 22 日までに自発休眠に導入され、少量の低温積算により自発休眠打破に至った可能性を完全に否定することはできない。しかし、その場合であっても横山の自発休眠打破に必要な低温要求量は CU. 200 以下であるということになる。一方、既知のナシ属植物、品種の低温要求量をみると、ニホンナシの主要品種の中で最も少ないとされる‘豊水’で CU. 800、台木種のチョウセンマメナシで CU. 400 程度である（Tamura ら、2001）。従って、横山の低温要求量を最も多く見積もった場合であっても既知のナシ属植物、品種に比べて著しく少なく、今後、少低温要求性ニホンナシ品種を育成するうえでの貴重な育種素材になるものと考えられた。

次に本研究の倍数性の調査結果から、横山、TH3 およびその F₁ 系統群が二倍体であること、並びに SSR マーカーを用いた親子鑑定の結果から、育成中の F₁ 系統群の両親は全て横山と TH3 であることが確認された（第 5.1 図）。これら F₁ 系統群が少低温要求性ニホンナシ品種を育成するための中間母本になるのか否かを判断するためには、横山の有する少低温要求性の形質が F₁ 系統群にどのように遺伝するかを明確にしておく必要がある。そこで、F₁ 系統群とその両親にあたる横山および TH3 の萌芽率を 3 年間にわたり調査した結果、いずれの調査日においても TH3 の萌芽率は横山の萌芽率に比べて低かったものの、TH3 の萌

芽率および F₁ 個体の萌芽率の平均値は年度毎で異なる推移を示した(第 5.2 図)。これは年度ごとに自発休眠の導入期が異なったことが影響したものと考えられた。F₁ 個体の萌芽率の平均値をみると、2008 および 2010 年度の調査では、12 月 22 日～1 月 5 日にかけて値は上昇したが、2009 年度の調査では値は低下した。このように一部の例外はあるものの全調査日の結果を俯瞰してみると、F₁ 個体の萌芽率の平均値は横山に比べ TH3 の萌芽率に近い値を示した。このように、TH3 が自発休眠の深度に関する優性遺伝子をホモでもつ可能性が示唆されたことから χ^2 検定により検証を行ったところこの仮説は棄却された(第 5.2 表)。近年、数種の落葉果樹において低温要求量に関与する QTL が確認されており、アンズ (*Prunus armeniaca* L.) では第 5 染色体上に (Campoy ら, 2011)、リンゴ (*Malus domestica* Borkh) では第 9 染色体上に (van Dyk ら, 2010) QTL が存在すると考えられている。ナシにおいても低温要求量に関与する QTL が存在するのであれば、交配に用いる両親よりも低温要求量が少ない F₁ 個体は作出されない。Tamura ら (2001) が述べる様に現存するニホンナシ品種間での交配では低温要求量の少ない品種を得ることが難しく、横山のような育種素材は必要不可欠といえる。しかしながら、果肉硬度の高い横山を育種親に用いた場合、肉質の良好な後代品種の育成は非常に困難となる。肉質の指標となる果肉硬度は遺伝力の強い形質であるため (町田・小崎, 1976)、現在栽培されているニホンナシと同程度の肉質をもつ少低温要求性品種を育成するためには、横山とニホンナシの F₁ 個体に再度ニホンナシを掛け合わせる必要がある。その際、F₁ 系統群の中から選抜する個体は、果肉硬度の低い肉質の密な個体が望ましく、既存のニホンナシより低温要求量が少ない個体でなければならない。F₁ 系統群の中では、系統番号 No. 74 が肉質の良好な個体であり育種素材として期待される。本研究で用いた F₁ 系統群の各調査日における萌芽率は、萌芽率の高い個体から

低い個体まで度数分布が幅広く分散したことから、自発休眠の深度が F₁ 個体ごとに大きく異なっていたことが予想される。この要因としては F₁ 系統群の両親にあたる横山と TH3 の低温要求量の差が非常に大きかったことが考えられる。一方で F₁ 系統群の中には横山と同等の萌芽率を示す個体も存在し、早期に自発休眠が打破した個体も確認された。一例を示すと、F₁ 系統群中の系統番号 No. 7, No. 76 および No. 170 は、2010 年度の全調査日において 50%以上の萌芽率を示し、自発休眠の打破に必要な低温要求量は CU. 300 以下であると推定された。このように、F₁ 系統群の中には高品質な少低温要求性ニホンナシ品種を育成するための中間母本となりうる個体が存在するものと考えられた。

また本研究では、横山、TH3 および F₁ 系統群の落葉期についても調査を行った。ニホンナシの落葉と自発休眠への導入との関連については不明確であるが、ブドウサンショウでは落葉後の発芽所要日数が急激に増加し自発休眠の深度が深くなると報告されている（前田ら、2007）。横山は、落葉日の前後で萌芽率の顕著な変化が見られなかったことから、落葉が発生しても自発休眠に導入しないとも考えられる。また F₁ 系統群の落葉日は TH3 の落葉日に比べ横山の落葉日に近かったことから、F₁ 系統群は落葉性に関して横山の特性を強く受け継いでおり、系統番号 No. 7 の落葉日は 12 月 19 日と TH3 より約 1 か月も遅かった。

一方、個体ごとに自発休眠の深度が異なることが示唆された F₁ 系統群であったが、展葉日に関しては個体間差が小さいという結果が得られた。自発休眠が打破され、他発休眠期に入った個体は、生育に適した気温に遭遇することで展葉するが、この展葉を促す温度への反応は個体間であまり差がなかったと考えられた。また横山と TH3 の展葉日には約 1 か月の差があり、F₁ 系統群の展葉日はその中間日付近の 4 月 9 日に集中していた。このような結果から、展葉期はポリジーンが関与する量的形質であるが、関与する遺伝子の数は少なく、低温

積算量の差異は展葉期に影響しないものと考えられた。

本研究により横山の育種素材としての重要性は確認された。その一方で、横山が自発休眠に導入するか否かという形質とその遺伝様式については不明確なままである。モモ (*Prunus persica* L. Batsch) では自発休眠に導入しない ‘Evergreen’ peach が確認されている。Rodriguez ら (1994) は ‘Evergreen’ peach と自発休眠に導入する品種間の交雑で得られた F₁ 個体が自発休眠に導入し、さらにその F₂ 個体のうちの約 1/4 にあたる個体が自発休眠に導入しなかったことから、自発休眠導入に関与する遺伝子は劣性遺伝子であると結論付けている。このような後代の形質分離を調査するためには、自殖による F₂ 系統群を育成しなければならないが、そのためには F₁ 個体が自家和合性である必要がある。モモは種全体が自家和合性であるため、問題なく調査を行えるが、他の多くの落葉果樹は自家不和合性であるため自家結実により後代を得ることが困難である。そのような中でニホンナシでは、‘二十世紀’の自家不和合性遺伝子である S₄ 遺伝子に変異し、自家和合性遺伝子 S₄sm となった自家和合性品種 ‘おさ二十世紀’ が実用化されている (佐藤ら, 1988)。S₄sm 遺伝子は一つでも保有すれば自家和合性となるが、対立遺伝子に S₁ または S₄ 遺伝子をもつ場合は自家不和合性になることが報告されている (齋藤ら, 2002)。本研究で F₁ 系統群の種子親としたニホンナシ系統 TH3 は ‘おさ二十世紀’ の自家授粉によって得られた後代であり、自家和合性遺伝子 S₄sm 遺伝子をホモにもつ。さらに、本研究で用いた F₁ 系統群の全ての個体が自家和合性遺伝子 S₄sm を保有することも確認された (第 5.3 図)。これら F₁ 系統群のいずれの個体も S₁ および S₄ 遺伝子を保有しないことが明らかになったことから、本研究に用いた F₁ 系統群は全て自家和合性であり、現在はこれら F₁ 系統群の自家授粉によって得られた F₂ 個体を育成している。今後、本 F₂ 系統群の自発休眠導入個体と非導入個体の分離比を調査することで、横山が

自発休眠に導入するか否かとそれに関与する遺伝子が ‘Evergreen’ peach と同様に劣性遺伝子であるか否かが明確になると考えられる。

第6節 摘要

‘おさ二十世紀’の自殖後代で S_4^{sm} 遺伝子をホモでもつニホンナシ系統 TH3, 台湾在来ナシ横山, およびそれらの交雑によって得られた F_1 系統群の萌芽率を3年間にわたり調査した。 F_1 個体は S 遺伝子の判定と SSR マーカーによる親子鑑定の結果から, 全個体がこの両親に由来する後代であると同定された。全調査日において横山の萌芽率は60%以上であり, 11月下旬~1月上旬までの間に自発休眠に導入しなかった。一方, TH3 の萌芽率は常に横山に比べて低く, その値は12月上旬から1月上旬にかけて徐々に上昇した。いずれの調査日ともに, F_1 個体が示す萌芽率は横山と TH3 の萌芽率の間に広く分布した。全9回の調査日のうち8回の調査日において, F_1 個体の萌芽率の平均値は横山より TH3 の萌芽率に近い値を示した。そこで TH3 が自発休眠の深度に関する優性遺伝子をホモでもつと仮定し χ^2 検定を行ったが, この仮定は棄却された。これらの結果から, 低温要求量を決める遺伝要因には QTL が存在すると考えられた。多くの F_1 個体の落葉期は TH3 の落葉日に比べ横山の落葉日に近かった。一方, F_1 個体の展葉期は横山と TH3 の展葉日のほぼ間にあたる4月9日に集中していた。

第6章 総括

総合考察

近年、海外の諸地域においてもニホンナシの栽培は盛んになっているが (Bell, 1991), ニュージーランドやブラジルでは低温積算量の不足による、春季の発芽不良が発生している (Kingston ら, 1990 ; Klinac・Geddes, 1995 ; Petri・Herter, 2002 ; Petri ら, 2002). 日本でも温暖化による落葉果樹の休眠問題が散見されており、本研究では、実際に発芽不良が懸念されている九州の 2 県におけるニホンナシの自発休眠の推移について調査を行った。その結果、熊本における‘豊水’の自発休眠打破期は鳥取よりも約 1 ヶ月遅く、熊本では CU. 1500 以上の低温要求量を必要とする品種の栽培は困難であると結論付けられた。各地域に適した低温要求量の品種を選択し栽培することは必要不可欠であり、本研究で新たに調査したニホンナシ品種の中では‘あきづき’, ‘夏そよか’, ‘涼月’および‘新甘泉’の 4 品種の CU が約 1000 と最も低かった。一方、最も低温要求量が多かった‘秀玉’は CU 約 2000 であり、ニホンナシの低温要求量には品種間に大きな差があることも確認された。このような低温要求量としての形質は、両親の優劣性を必ずしも反映しているわけではなく、低温要求量の多い‘秀玉’を花粉親に用いた場合でも CU 約 1000 の‘夏そよか’が作出されている。また、‘秋甘泉’は両親である‘おき二十世紀’と‘豊水’のほぼ間の値をとった低温積算量を保有しており、低温要求量の決定には複数の遺伝子が関与していると推測される。

近年、数種の落葉果樹において低温要求量に関与する QTL が確認されており、

アンズ (*Prunus armeniaca* L.) では第 5 染色体上に (Campoy ら, 2011), リンゴ (*Malus domestica* Borkh) では第 9 染色体上に (van Dyk ら, 2010) それぞれ QTL が存在すると考えられている. ナシにおいても低温要求量に関与する QTL が存在するのであれば, 少低温要求性品種を育成するためには, 既知のニホンナシ品種に比べて著しく少ない低温要求量をもつナシ属植物が育種素材として必要となる. 既知のナシ属植物, 品種の低温要求量をみると, ニホンナシの主要品種の中で最も少ないとされる '豊水' では CU. 800, 台木種のチョウセンマメナシでも CU. 400 程度であるが (Tamura ら, 2001), 台湾ナシ横山の低温要求量は最も多く見積もった場合であっても既知のナシ属植物, 品種に比べて著しく少なく, 少低温要求性ニホンナシ品種を育成するうえでの貴重な育種素材になるものと考えられた. 一方, TH3 と横山の交雑により得られた F₁ 系統群とその両親の萌芽率を 3 年間にわたり調査した結果, いずれの調査日においても TH3 は横山に比べて低く, F₁ 系統群はそれらの平均値の間に広く分布し, F₁ 個体の萌芽率の平均値は横山に比べ TH3 の萌芽率に近い値を示した. TH3 が自発休眠の深度に関する優性遺伝子をホモでもつ可能性が示唆されたことから χ^2 検定により検証を行ったが, この仮説は棄却され, ナシにおいても低温要求量に関与する QTL が存在すると考えられた. これに加え, F₁ 系統群の中の系統番号 No. 74 は肉質が良好な個体であり低温要求量も少なかったことから育種素材として期待される.

一方, 低温積算量が蓄積しにくい地域では少低温要求性系統を台木として利用する方法も栽培技術の一つとして注目される. Westwood・Chestnut (1964) は低温積算が不十分な状態の 'Bartlett' を低温要求量の多い *P. communis* と少ない *P. calleryana* に接ぎ木し, 自発休眠打破に及ぼす台木の役割を調査した. その結果, 台木に少低温要求性系統を用いることで穂木の自発休眠打破を促進させる

効果があると報告している。本研究において、台木として広く利用されている *P. calleryana* (No. 12) の冬期における萌芽率は、調査期間内で常に 30%以上の値を示しており、少低温要求性台木としても期待された。

このような低温要求量に着目した研究の一方で、横山が自発休眠に導入するか否かという形質とその遺伝様式については不明確なままである。モモ (*Prunus persica* L. Batsch) では自発休眠に導入しない ‘Evergreen’ peach が確認されており、Rodriguez ら (1994) は ‘Evergreen’ peach と自発休眠に導入する品種間の交雑で得られた F₁ および F₂ 個体の調査から自発休眠導入は劣性形質であると結論付けている。このような後代の形質分離を調査するためには、自殖による F₂ 系統群を育成しなければならないが、そのためには F₁ 個体が自家和合性である必要がある。本研究で用いた F₁ 系統群の全ての個体が自家和合性遺伝子 S₄sm を保有し、いずれの個体も S₁ および S₄ 遺伝子を保有しないことが明らかとなり、現在はこれら F₁ 系統群の自家授粉によって得られた F₂ 個体を育成している。今後、本 F₂ 系統群の自発休眠導入個体と非導入個体の分離比を調査することで、横山の自発休眠導入性とその遺伝様式が明確になると考えられた。

これに加え、本研究ではニホンナシが自発休眠に導入する気候条件についても検討を行った。一般に落葉果樹の芽の休眠導入は、短日と低温によって誘導されると言われているものの (Kawase, 1961 ; 東部ら, 1998), これを明確にした報告は極めて少ない。本実験ではニホンナシ ‘ゴールド二十世紀’ の自発休眠導入が長日条件では阻止されず、低温が休眠導入に関与していると考えられた。さらに、自発休眠導入に必要な温度の検討を行ったところ、5°C 条件下では自発休眠状態に入ったと考えられるものの、15°C 条件下では一旦萌芽率は低下したが、遭遇する時間が長くなるとともに休眠の深さが再び浅くなるものと推測された。また、植物の芽の休眠と密接な関連があると考えられている植物ホ

ルモンの ABA 含量は、加温区に比べ自発休眠に導入した露地区で高い値を示した。これまでも、自発休眠期における植物ホルモン含量の変化については多くの研究が行われており (Chandler ら, 1937 ; Donoho ら, 1957 ; Erez ら, 1979 ; Wang ら, 1985 ; Powell, 1987 ; Dennis, 1994), ブドウを用いた研究 (During・Alleweldt, 1973) では、休眠開始期から中期の枝梢中に蓄積される ABA が休眠の導入および深度と関連があると指摘されている。ニホンナシについては、自発休眠導入後から打破期にかけて低温積算に伴う花芽原基中の ABA 含量の低下が報告されており (田村ら, 1992), 本研究の結果として示された導入期における ABA 含量の増加は、ニホンナシの自発休眠導入時に必要な条件であると考えられた。

これまでの多くの研究から、低温馴化の過程で ABA 含量が増加すること (Lang ら, 1994), 細胞膜の脂質組成が変化すること (Uemura・Steponkus, 1994 ; Uemura ら, 1995), 糖などの細胞内適合溶質が蓄積すること (Koster・Lynch, 1992 ; Wanner・Junttila, 1999 ; Kamata・Uemura, 2004) および多くの低温誘導性遺伝子が発現することが明らかにされている (Thomashow, 1999)。本研究では、ニホンナシの自発休眠機構の解明を目的とし、自発休眠の導入期、最深期、打破期の 3 つのステージ間で増幅バンド強度の異なる 124 個の cDNA クローンの単離に成功した。

その中の No. 15 と No. 205 は水の輸送や脱水反応に関わる機能性遺伝子として確認された。自発休眠導入時には細胞内で脱水反応が起こっており、対照的に打破期では水分含量の増加が報告されている (望岡ら, 1996)。導入期から最深期にかけて発現量が増加し、打破期には低下した No. 15 は、膜タンパク質として知られているアクアポリンの一種である Tonoplast intrinsic protein (TIP) 1 をコードする遺伝子と高い相同性を示した。低温に対する反応や適応に関する機

構には多くのアクアポリンが関与しており (Mauel ら, 2008) , モモの自発休眠期における Pp- γ TIP1 遺伝子の発現レベルが少低温要求性品種に比べ, 多低温要求性品種で高いことも示されている (Yooyongwech ら, 2009). また, ニホンナシおよびナシ属植物において, 種間および季節間で膜の脂肪酸組成や耐寒性に差異があることも報告されている (Liao ら, 1996, 1997 ; 松本ら, 2010). これらの研究からも, 自発休眠期における芽の水分含量の調節を担う遺伝子が自発休眠の導入や打破を調節していると考えられる.

また, No. 205 は不凍タンパク質の一つとして知られている Thaumatin-like protein をコードする遺伝子と高い相同性を示しており (Ferullo・Griffith, 2001; Griffith ら, 2005) , この遺伝子は最深期から打破期にかけて発現量が低下し, プロテオーム解析の結果からも自発休眠最深期において実際に発現しているタンパク質として同定された. 植物は耐凍性を高めるため, 冬季にこのようなタンパク質を合成していると考えられるが, このタンパク質をコードする遺伝子の発現量はシアナミド処理によっても徐々に低下したため, 自発休眠の深度の調節にも関与していると推測された.

さらに, 解糖系に関与する Fructose-bisphosphate aldolase も自発休眠最深期で発現量が高まる遺伝子として単離され, タンパク質レベルでも確認された. この他にも, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Phosphoglycerate kinase, Triosephosphate isomerase などいくつかの解糖系で働く酵素が自発休眠最深期で同定され, 自発休眠の深度が深い時期でも解糖系での反応は活発に行われているものと考えられる. また, アスコルビン酸を基質として過酸化水素を無毒化する L-ascorbate peroxidase は最深期の中でも, シアナミド処理区では確認されず対照区のみで同定された. 自発休眠打破との関連性が示唆されている過酸化水素 (Kuroda ら, 2002) の消去系の酵素である Peroxidase は酸化還元酵素に分類

され、自発休眠打破の生理的機構の解明を目的とした多くの研究が報告されている (Noriega ら, 2007 ; Ben ら, 2012). Kuroda ら (2002) は、ニホンナシの芽の過酸化水素含量が自発休眠の打破直前まで増加することを確認しており、自発休眠の最深期では増加した過酸化水素を分解する L-ascorbate peroxidase の含量が多くなったため、このタンパク質が特異的に単離されたと推測される。

このような自発休眠最深期で発現レベルが高まるタンパク質やそれをコードする遺伝子に加え、本研究では導入期から最深期にかけて発現量が低下する遺伝子も単離された。その中の No. 19 と No. 40 の 2 つの遺伝子は、ニホンナシでは 11 月から 12 月にかけての発現量の低下がみられたが、タイワンナシでは逆に発現量が増加した。この No. 19 と No. 40 は、それぞれ Auxin-responsive family protein, E3 ubiquitin ligase PUB14 をコードする遺伝子と高い相同性を示した。また、最深期から打破期にかけて発現量が増加し、シアナミド処理により発現量が徐々に増加した No. 245 は Auxin influx carrier component と高い相同性を示した。オーキシンと自発休眠との関係について研究された事例は多く、ブドウでは秋から冬にかけての茎内のオーキシン活性の低下と、春季における増加が確認されている (Nakano ら, 1980)。ニホンナシでも内生 IAA 含量が自発休眠導入期に低下し打破期に増加することが確認されている (田村ら, 1992)。このような自発休眠期におけるオーキシン含量の変化とオーキシン関連遺伝子である No. 19 と No. 245 の発現量の変化は一致しており、これら 2 つの遺伝子は自発休眠の導入や打破と密接に関係していると考えられる。一方、本研究で単離された遺伝子の翻訳産物である E3 ubiquitin ligase はタンパク質にユビキチンを結合させるタンパク質の一種であり、オーキシンと E3 ユビキチンリガーゼが結合し、AUX/IAA タンパク質をユビキチン化することが報告されている (Pan ら, 2009)。近年の研究では、ヤマナラシ (*Populus tremula* × *P.tremuloides*) の自発休眠導入

後にオーキシン処理を行っても AUX / IAA 遺伝子の発現誘導されないことも確認されている (Baba ら, 2011) . さらに, ユビキチンリガーゼとオーキシンの複合体は, 自発休眠に関与する転写調節因子として知られている MADS box protein family を誘導する (Chao ら, 2007). 自発休眠の推移によって発現量が変化する遺伝子として着目されている MIKC-type dormancy-associated MADS-box 遺伝子は, ニホンナシに加え, キイチゴ (*Rubus idaeus* L.), ラズベリー (*Euphorbia esula* L.) , モモでも自発休眠関連遺伝子として報告されており (Mazzitelli ら, 2007 ; Horvath ら, 2008 ; Yamane ら, 2008 ; Li ら, 2009 ; Ubi ら, 2010), このような遺伝子の発現を調節するユビキチンリガーゼとオーキシンの複合体は自発休眠の導入や打破を制御する因子であると考えられた.

本研究により単離されたこのような遺伝子は, ニホンナシの自発休眠導入期と打破期を予測する発現マーカーとしても有用性があり, ニホンナシの自発休眠導入に関わる気候条件も明らかとなったことから, 既存の打破期を予測するモデルの起算開始日とそれに伴う打破日の予測もより正確になると考えられた. さらに, 明確となってきた自発休眠機構と実際に発現が確認されたタンパク質は, 今後のシアナミドに代わるより安全で打破効果が顕著な休眠打破剤の開発にも結び付くものと思われる. また, TH3 と横山の F₁ 個体である系統番号 No. 74 は, 少低温要求性ニホンナシ品種を育成するための中間母本に成りうると考えられ, 本研究の成果が様々な環境下でのより安定したニホンナシ栽培に繋がるものと期待される.

要旨

近年、ニホンナシ栽培は、ブラジル、ニュージーランド、オーストラリアでも盛んになっている。このような栽培地域の拡大に伴い、低緯度地域での芽の自発休眠打破に必要な低温要求量の不足が問題のひとつとして挙げられるようになってきた。本研究では、自発休眠機構の解明と少低温要求性ニホンナシ品種の育成の可能性について検討した。

1. ナシの芽の自発休眠打破に要する低温要求量

ニホンナシ品種およびナシ属野生種の萌芽率を調査し、自発休眠打破に必要な低温要求量を明らかにした。‘豊水’、‘幸水’、‘ゴールド二十世紀’および‘新高’の葉芽は、花芽に比べ低温要求量が多かった。3地域における‘豊水’と‘新高’の自発休眠は、低温積算量の蓄積の早さに伴い、鳥取、佐賀、熊本の順で打破した。熊本における両品種の打破期である2月中旬の低温積算量は1566であった。この結果から、熊本においてはCU. 1500以下の低温要求量を有する品種を選択する必要があると示唆された。調査を行ったニホンナシ品種の中では、‘あきづき’、‘夏そよか’、‘涼月’および‘新甘泉’の低温要求量が最も少なかった。一方、最も多かったのは‘秀玉’であり、ニホンナシ品種の低温要求量には、800–1800のレンジが確認された。調査を行ったナシ属野生種のうち14種は、1月7日から2月4日の間に萌芽率が60%に達した。その中の *P. calleryana* (No.12) は低温要求量が最も少なく、低温積算量が蓄積しにくい地域における少低温要求性台木として期待された。

2. ニホンナシの芽の自発休眠導入の気象要因とその機構

ハウス栽培，気温および日長がニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の芽の自発休眠の導入に及ぼす影響を調査した．ハウス栽培区は露地栽培区に比べて20日程度花芽分化を促進したが，花芽および葉芽の自発休眠導入期には影響を与えず，自発休眠打破期への影響もわずかであった．ポット樹を用いて長日処理および温度処理の影響を調査したところ，自発休眠導入期の加温は導入を阻止したが，16時間日長は導入を阻害しなかった．そこで，自発休眠導入に有効な温度の調査を行ったところ，5°Cは自発休眠の導入に有効であったが，15°Cは自発休眠の導入を阻害した．11月中旬の露地区における葉芽のABA含量は，低温による自発休眠の導入に伴い上昇したが，加温区では低い値を示した．このように，ニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の葉の自発休眠は，主として秋季の低温によって誘導されるものと考えられた．

3. ニホンナシの芽の自発休眠導入および打破に関する遺伝子の解析

ニホンナシの自発休眠機構の解明を目的として，DD法により自発休眠の導入および打破に関する候補遺伝子を単離した．GeneFishing™ DEG Premix Kitの全120プライマーセットを使用し，導入期，最深期および打破期でバンド強度の異なる124個のcDNAクローンを単離した．そのうち，導入期，最深期および打破期でバンド強度が強かったクローンは，それぞれ30, 54, 19クローン，導入期と打破期の両ステージでバンド強度が強かったクローンは21クローンであった．BLASTXによる相同性検索の結果，12個の遺伝子が機能性遺伝子として確認され，ステージ間で有意な発現量の差がみられた8クローンについてリアルタイムPCR法で発現解析を行った．ニホンナシの自発休眠導入期から最深期にかけて発現量が低下したNo. 19とNo. 40の2つの遺伝子は，同時期のタイ

ワンナシの芽において発現量が増加した。この 2 つの遺伝子は、それぞれ Auxin-responsive family protein と E3 ubiquitin ligase をコードする遺伝子と高い相同性を示すことが確認された。No. 15 は Tonoplast intrinsic protein (TIP) 1, No. 205 は Thaumatin-like protein をコードする遺伝子と高い相同性を示し、これらの遺伝子は最深期から打破期にかけて発現量が低下した。また No. 15 はシアナミド処理 24 時間後に発現量が増加した後、72 時間後には低下し、No. 205 はシアナミド処理後、徐々に発現量が低下した。

これらの遺伝子は、自発休眠の導入および打破の調節に関与していると考えられた。

4. ニホンナシの芽の自発休眠打破に関与するタンパク質の解析

ニホンナシの自発休眠打破機構の解明を目的として、自発休眠最深期と打破期の芽で発現しているタンパク質を比較し、質量分析法によりタンパク質の同定を行った。二次元電気泳動後のゲルを銀染色法で染色した結果、それぞれのゲルで約 300 個のスポットが確認され、4 区を比較したところ、pI 約 4.9・M.W. 約 32 kDa, pI 約 5.0・M.W. 約 30 kDa, pI 約 5.2・M.W. 約 30 kDa の 3 つのスポットは、4 区間で形状および濃さに違いがみられた。また、12 月 24 日の対照区では確認されなかった pI 約 5.4・M.W. 約 24 kDa のスポットが 12 月 24 日のシアナミド処理区および 2 月 16 日の両処理区で確認された。

一次元 SDS-PAGE 後のゲルを用いた質量分析の結果、78 個のタンパク質が 12 月 24 日の両処理区間で共通して同定された。その中の 38 個は酵素として確認され、酸化還元酵素の割合が 41%と最も多かった。また、12 月 24 日と 2 月 16 日の両日で共通して同定されたタンパク質は 34 個であった。一方、L-ascorbate peroxidase 1 は 4 処理区中の 12 月 24 日の対照区のみで同定された。

5. ニホンナシ系統 TH3 と少低温要求性タイワンナシ横山の F₁ における自発休眠特性

‘おさ二十世紀’の自殖後代で S_4^{sm} 遺伝子をホモでもつニホンナシ系統 TH3, 台湾在来ナシ横山, およびそれらの交雑によって得られた F₁ 系統群の萌芽率を 3 年間にわたり調査した. F₁ 個体は S 遺伝子の判定と SSR マーカーによる親子鑑定の結果から, 全個体がこの両親に由来する後代であると同定された. 全調査日において横山の萌芽率は 60%以上であり, 11 月下旬~1 月上旬までの間に自発休眠に導入しなかった. 一方, TH3 の萌芽率は常に横山に比べて低く, その値は 12 月上旬から 1 月上旬にかけて徐々に上昇した. いずれの調査日ともに, F₁ 個体が示す萌芽率は横山と TH3 の萌芽率の間に広く分布した. 全 9 回の調査日のうち 8 回の調査日において, F₁ 個体の萌芽率の平均値は横山より TH3 の萌芽率に近い値を示した. そこで TH3 が自発休眠の深度に関する優性遺伝子をホモでもつと仮定し χ^2 検定を行ったが, この仮定は棄却された. これらの結果から, 低温要求量を決める遺伝要因には QTL が存在すると考えられた. 多くの F₁ 個体の落葉期は TH3 の落葉日に比べ横山の落葉日に近かった. 一方, F₁ 個体の展葉期は横山と TH3 の展葉日のほぼ間にあたる 4 月 9 日に集中していた.

Summary

The cultivation area of Japanese pear has been extending in Brazil, New Zealand and Australia in recent year. However, a lack of winter chilling for breaking bud endodormancy has been occurring in the low-latitude regions. We studied the mechanism of endodormancy and breaking system of Japanese pear cultivar that has low chilling requirements in the present paper.

1. The chilling requirement for breaking bud endodormancy in pear plants

We investigated the occurrence of bud break in Japanese pear cultivars and wild pear species to estimate the chilling requirement for breaking bud endodormancy. The leaf buds of the ‘Hosui’ and ‘Kosui’ showed a higher chilling requirement than their lateral floral buds. The dormancy breaking periods for the ‘Hosui’ and ‘Niitaka’ cultivars in three areas, namely Tottori, Saga, and Kumamoto, were completely dependent on the chilling accumulation in each cultivar and area. Among these areas, a CU value of 1,566 was observed in Kumamoto in mid- or late February. This result suggest that pear cultivars having less than 1,500 CU should be selected for commercial production in that specific area. Among the observed Japanese pear cultivars, ‘Akizuki,’ ‘Natusoyoka,’ ‘Ryougetsu,’ and ‘Shinkansen’ showed the lowest chilling requirement, whereas ‘Syuugyoku’ showed the highest. The chilling requirements of Japanese pears ranged from 800 to 1800 CU. Among the examined wild pear plants, a bud break incidence of at least 60% was observed in 14 plants during the period from January 7 to February 4. Among these, *P. calleryana* (No. 12) showed the lowest chilling requirement and was thus identified as a useful rootstock for warm-winter regions.

2. The mechanism and weather factor on bud endodormancy induction in Japanese pear

We investigated the effects of plastic house cultivation, temperature and day length during late autumn on induction of endodormancy in the Japanese pear ‘Gold Nijisseiki’. The plastic house cultivation advanced the initiation and development of flower bud by about 20 days compared with that under open-field cultivation. However, the plastic house cultivation was hardly effective in the induction and development of endodormancy of either flower or leaf buds. The potting experiment demonstrated that the lack of chilling inhibited the induction of bud dormancy, but the 16 hours photoperiod did not prevent dormancy induction. Temperature of 5°C was effective for inducing leaf bud endodormancy in the cuttings, whereas a temperature of 15°C was ineffective. Leaf bud ABA concentrations in open-field cultivated ‘Gold Nijisseiki’ were increased with the induction of endodormancy by chilling in mid-November. However, the ABA concentrations in un-chilled plants were lower. In conclusion, the endodormancy of the Japanese pear ‘Gold Nijisseiki’ was mainly induced by low temperatures in autumn.

3. Expression analysis of candidate genes related to endodormancy induction and breaking in Japanese pear

To identify functional genes related to endodormancy in pear plants, we isolated 124 clones that exhibited differential expression between the 3 periods of bud endodormancy in Japanese pear by using the GeneFishing polymerase chain reaction (PCR) method. Among them, 30, 54, and 19 clones were highly expressed during the

induction period (IP), deepest period (DP), and breaking period (BP) of endodormancy, respectively. In addition, 21 clones were overexpressed at IP and BP. Basic Local Alignment Search Tool searches revealed 13 of these clones to be known genes. Using the results of real-time PCR analysis, we focused on a subset of 8 clones as potential candidate genes related to bud endodormancy. The expression of 2 genes decreased from IP to DP during endodormancy in Japanese pear, but increased in Taiwanese pear, a plant that does not enter endodormancy during the same period. These genes were highly homologous to those encoding auxin-responsive family protein and E3 ubiquitin ligase PUB14. Expression of tonoplast intrinsic protein 1 increased briefly before BP and after 24 h of hydrogen cyanamide (HC) treatment. During BP, genes highly homologous to those encoding thaumatin-like protein and auxin influx carrier component showed decreased and increased expressions, respectively. This was also observed following HC treatment. We suggest that the genes identified in this study play a role in the regulated induction or breaking of endodormancy in the vegetative buds of Japanese pear.

4. Analysis of proteins related to bud endodormancy breaking in Japanese pear

To identify proteins related to breaking of endodormancy in pear plants, we compared protein spots that exhibited differential expression between Hydrogen Cyanamid (HC) treated and untreated Japanese pear on deepest and breaking periods of endodormancy by using the two-dimensional electrophoretic method (2D). Approximately 300 spots were exhibited in each gel after silver staining, we focused 3 spots that were differential density or figure among the 4 gels. pI value and molecular weight of these spots were pI 4.9 • M.W. 32 kDa, pI 5.0 • M.W. 30 kDa and pI 5.2 • M.W. 30 kDa, respectively. In

addition, the spot of pI 5.4 · M.W. 24 kDa was specifically shown in HC treatment on 24th December and both treatment on 16th February.

From the result of mass spectrometry using gel after SDS-PAGE, 78 proteins were identified as protein common to both HC treatment and untreated on 24th December. Among them, 38 proteins were classified as enzyme, and oxidoreductase was the largest, accounting for 41% of the total. L-ascorbate peroxidase 1 was specifically identified only untreated on 24th December among 4 treatments.

5. Characteristics of endodormancy on F₁ hybrids between Japanese pear TH3 and Taiwanese pear Yokoyama

We investigated the budbreak percent in Taiwanese pear Yokoyama, Japanese pear strain TH3 which S₁ of 'Osa-Nijisseiki' having homozygote of S₄sm gene and their F₁ for 3 years. All F₁ plants were identified as the offspring from a cross of TH3×Yokoyama by S-allele genotypes and SSR marker analysis. The percentage of budbreak in Yokoyama was higher than 60% on all observational days, thus Yokoyama did not induce endodormancy from late November to early January for the 3 years. The percentage of budbreak in TH3 was lower than Yokoyama on any observational days and it gradually increased from early December to early January. The percentage of budbreak in F₁ plants was widely distributed between that of Yokoyama and TH3 on all observational days. On 8 times among the all observational days of 9 times, the average value of the budbreak percent in F₁ plants was near to that of TH3 rather than Yokoyama. We formulated hypothesis that TH3 has homozygote of a dominant gene involved depth of endodormancy, but the hypothesis was rejected by chi-square test. From these results, it was suggested that pear plant had quantitative trait loci to decide chilling

requirements as the genetic factor. The defoliation period in many F₁ plants was close to that in Yokoyama rather than TH3. Most F₁ plants foliated in April 9th when the day of foliation between that of Yokoyama and TH3.

謝辞

本研究の実施にあたり，終始貴重なご指導を賜りました鳥取大学農学部園芸学研究室教授，田村文男博士に深甚な感謝の意を申し上げます．また，多岐に渡りご指導，ご助言を賜りました鳥取大学農学部フィールドサイエンスセンター教授，中田昇博士，山口大学農学部教授，執行正義博士，鳥取県立農業大学校准教授，池田隆政博士，弘前大学農学生命科学部助教，松本和浩博士に厚く御礼申し上げます．農研機構果樹研究所上席研究員，森口卓哉博士，主任研究員，伴雄介博士には実験実施にあたり適切にご示唆を頂きました．心より御礼申し上げます．最後に，鳥取大学園芸学研究室の皆様には，多岐に渡りご協力，ご支援して頂きました．私を支えて下さった多くの方々に心から感謝の意を表します．

引用文献

- Arora, R., M. Wisniewski and L. J. Rowland. 1996. Cold acclimation and alterations in dehydrin-like and bark storage proteins in the leaves of sibling deciduous and evergreen peach. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121:915-919.
- 浅野聖子・奥野 隆. 1990. ニホンナシ‘幸水’,‘豊水’の自発休眠覚醒期と低温要求量. 埼玉園試報. 17:41-46.
- Baba, K., A. Karlberg, J. Schmidt, J. Schradera, T. R. Hvidstenb, L. Bako and R. P. Bhalerao. 2011. Activity-dormancy transition in the cambial meristem involves stage-specific modulation of auxin response in hybrid aspen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:3418-3423.
- Bell, R. L. 1991. Pears (*Pyrus*). *Acta Hort.* 290:657-697.
- Ben, M. H., M. A. Vadel, J. M. C. Genus and H. Khemira. 2012. Effects of hydrogen cyanamide on antioxidant enzymes' activity, proline and polyamine contents during bud dormancy release in superior seedless grapevine buds. *Acta Physiol Plant.* 34:429-437.
- Bi, Y. D., Z. G. Wei, Z. Shen, T. C. Lu, Y. X. Cheng, B. C. Wang and C. P. Yang. 2011. Comparative temporal analyses of the *Pinus sylvestris* L. var. *mongolica* litv. Apical bud proteome from dormancy to growth. *Mol. Biol. Rep.* 38:721-729.
- Bielenberg, D. G., Y. Wang, S. Fan, G. L. Reighard, R. Scorza and A. G. Abbott. 2004. A deletion affecting several gene candidates is present in the peach Evergrowing mutant. *J. Hered.* 95:436-444.
- Bielenberg, D. G., Y. Wang, Z. Li, T. Zhebentyayeva, S. Fan, G. L. Reighard, R. Scorza and A. G. Abbott. 2008. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in

- peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genet. Genomes*. 4:495-507.
- Broome, O. C. and R. H. Zimmerman. 1976. Breaking bud dormancy in tea crabapple (*Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.) with cytokinins. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101:28-30.
- Campoy, J. A. , D. Ruiz, J. Egea, J. G. David, J. M. Celton and P. Martinez-Gómez. 2011. Inheritance of flowering time in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait loci (QTLs) using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28:560-568.
- Chandler, W. H., D. S. Brown, M. H. Kimball, G. L. Philip, W. P. Tufts and G. P. Weldon. 1937. Chilling requirements for opening of buds on deciduous orchard trees and some other plants in California. *Calif. Agr. Expt. Sta.* 63.
- Chao, W. S., M. E. Foley, D. P. Horvath and J. V. Anderson. 2007. Signals regulating dormancy in vegetative buds. *Int. J. Plant. Biol. Dev.* 1:49-56.
- Chavarria G., F. G. Herter, M. do C. B. Raseira, A. C. Rodrigues, C. Resser and J. B. da Silva. 2009. Mild temperatures on bud breaking dormancy in peaches. *Ciência Rural*. 39:2016-2021.
- 中央果実基金. 1994. 米国における梨の生産・流通事情調査.
- Corgan, J. N. and C. Peyton. 1970. Abscisic acid levels in dormant peach flower buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95:770-774.
- Damerval, C., D. Vienne, M. Zivy and H. Thiellement. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*. 7:52-54.

- Dennis, Jr. F. G. 1994. Dormancy-what we know (and don't know). HortScience. 29:1249-1255.
- Donoho, C. W., J. David and R. Walker. 1957. Effect of gibberellic acid on breaking of rest period in elberta peach. Science. 126:1178-1179.
- Duering, H. and G. Alleweldt. 1973. The annual cycle of abscisic acid in vegetative organs of grapevines. Vitis. 12:26-32.
- Emmerson, J. G. and L. E. Powell. 1978. Endogenous abscisic acid in relation to rest and bud burst in three *Vitis* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103:677-680.
- Erez, A., G. A. Couvillon and C. H. Hendershott. 1979. Quantitative chilling enhancement and negation in peach buds by high temperatures in daily cycle. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104:536-540.
- Faoro, I. D. 2002. Japanese pear growing in Brazil. Acta Hort. 587:97-105.
- Ferullo, J. M. and M. Griffith. 2001. Mechanisms of cold acclimation. In: Basra AS (ed) Crop responses and adaptations to temperature stress. Food Products Press, New York. 109-150.
- Gariglio, N., D. E. González Rossia, M. Mendowa, C. Reig and M. Agusti. 2006. Effect of artificial chilling on the depth of endodormancy and vegetative and flower budbreak of peach and nectarine cultivars using excised shoots. Sci. Hort. 108:371-377.
- Gemma, H. 1995. Dormancy breaking in Japanese pears grown in a heated greenhouse. Acta Hort. 395:57-68.
- Gharahdaghi, F., C. R. Weinberg, D. A. Meagher, B. S. Imai and S. M. Mische. 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. Electrophoresis.

20:601.

Griffith, M., C. Lumb, S. B. Wiseman, M. Wisniewski, R.W. Johnson and A. G. Marangoni. 2005. Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. *Plant Physiol.* 138:330-340.

Guy, L. C. 1990. Cold accumulation and freezing stress tolerance : role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:187-223

Hatch, A. H. and D. R. Walker. 1969. Rest intensity of dormant peach and apricot leaf buds as influenced by temperature, cold hardiness, and respiration. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 94:304-307.

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.

Horvath, D. P., W. S. Chao, J. C. Suttle, J. Thimmapuram and J. V. Anderson. 2008. Transcriptome analysis identifies novel responses and potential regulatory genes involved in seasonal dormancy transitions of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *BMC Genomics.* 9:536

Iwasaki, K. and R. J. Weaver. 1977. Effect of chilling, calcium cyanamide, and bud scale removal on bud break, rooting, and inhibitor content of buds of 'Zinfandel' grape (*Vitis vinifera* L.). *J. Amer.Soc. Hort. Sci.* 102:584-587.

Jimenez, S., A. L. Lawton-Rauh, G. L. Reighard, A. G. Abbott and D. G. Bielenberg. 2009. Phylogenetic analysis and molecular evolution of the dormancy-associated MADS-box genes from peach. *BMC Plant Biology.* 9:81.

梶浦一郎. 1983. ニホンナシの起源と品種の地理的文化. *育種学最近の進歩.* 25:3-13.

- 梶浦一郎・佐藤義彦. 1990. ニホンナシの育種及びその基礎研究と栽培品種の来歴及び特性. 果樹試験場報告. 特 1.1-329.
- 梶浦一郎. 1994. ナシ. 園芸学会監修. 日本の園芸. 朝倉書店. 東京. 43-52.
- 梶浦一郎. 2008. 日本果物史年表養賢堂. 東京.
- Kamata, T. and M. Uemura. 2004. Solute accumulation in wheat seedlings during cold acclimation: contribution to increased freezing tolerance. *CryoLetters*. 25:311-322.
- Kawase, M. 1961. Growth substances related to dormancy in *Betula*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 78:532-544.
- 菊池秋雄. 1948. 果樹園芸学. 上巻. p.64-121. 養賢堂. 東京.
- Kim, Y. J., C. I. Kwak, Y. Y. Gu, I. T. Hwang and J. Chun. 2004. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTech*. 36:424-426.
- Kingston, C. M., D. J. Klinac and C. W. Epenhuijsen. 1990. Floral disorders of nashi (*Pyrus serotina*) grown in New Zealand. *New Zeal. J. Crop Hort.* 18:157-159.
- Klinac, D. J. and B. Geddes. 1995. Incidence and severity of the floral bud disorder “budjump” on nashi (*Pyrus serotina*) grown in the Waikato region of New Zealand. *New Zeal. J. Crop Hort.* 23:185-190.
- Koster, K. L. and D. V. Lynch. 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiol.* 98:108-113.
- Krishina, P., M. Sacco, J. F. Cherutti and S. Hill. 1995. Cold-induced accumulation of hsp 90 transcripts in brassica napus. *Plant Physiol.* 107:915-923.
- Kubota, N. and M. Miyamuki. 1992. Breaking bud dormancy in grapevines with garlic paste. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 177:898-901.
- 久保田尚浩・楠原清文. 1997. モモとカキの芽の休眠の様相およびその打破につ

- いて. 園学雑. 66 (別) 2:150-151.
- Kuroda, H., T. Sugiura and D. Ito. 2002. Changes in hydrogen peroxide content in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) in relation to breaking of endodormancy. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 71:610-616.
- 黒田治之. 2004. アンケート調査から見た我が国の果樹農業に対する気候温暖化の影響. 平成 15 年度果樹農業生産構造に関する調査報告書. 果樹農業に対する気候変動の影響に関する調査. 中央果樹基金調査資料. 189:100-129.
- Kuroda, H., T. Sugiura and H. Sugiura. 2005. Effect of hydrogen peroxide on breaking endodormancy in flower buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai)
- 黒井伊作・白石義行・今野 茂. 1963. ブドウの休眠打破に関する研究 (第 1 報). ガラス室栽培樹の自発休眠短縮に及ぼす石灰窒素処理の効果. 園学雑. 32: 176-180.
- 黒木克翁・秋吉大貴・竹村圭弘・須藤幸子・武田 誠・富山政之・田村文男. 2009. ニホンナシ主要品種の芽の自発休眠打破に及ぼすシアナミド処理の影響. 園学雑. 8 (別) 2:149.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
- Lang, V., E. Mantyla, B. Welin, B. Sundberg and T. Palva. 1994. Alterations in water status endogenous abscisic acid content, and expression of *rab 18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104:1341-1349.
- Li, Z., G. L. Reighard, A. G. Abbott and D. G. Bielenberg. 2009. Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. J. Expt. Bot.

60:3521-3530.

Liao, R., K. Tanabe, F. Tamura and A. Itai. 1996. Seasonal variations in fatty acid composition and cold hardiness of Japanese pear in response to air temperature and growing stages. *Environ. Control Biol.* 34:303-311.

Liao, R., K. Tanabe, F. Tamura and A. Itai. 1997. Changes of lipid metabolism and their effects on cold hardiness of Japanese pear during flowering and fruit setting periods. *Environ. Control Biol.* 35:21-28.

前田隆昭・米本仁巳・樋口浩和・奥田 均・萩原 進・谷口正幸. 2007. ブドウサンショウ (*Zanthoxylum piperitum* (L.) DC.f.*inerme* Makino) 樹の休眠. *園学研.* 6:565-569.

町田 裕・小崎 格. 1976. ニホンナシ育種における果実品質の数量的研究 (第2報) 交雑実生集団の統計学的考察. *園学雑.* 44:325-329.

松本和浩・加藤正浩・竹村圭弘・田辺賢二・田村文男. 2010. 秋季の窒素施肥量がニホンナシの耐寒性と脂質含量に及ぼす影響. *園学研.* 9:339-344.

Maurel, C. 2007. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 58:2227-2236

Maurel, C., L. Verdoucq, D. T. Luu and V. Santoni. 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:595-624.

Mazzitelli, L., R. D. Hancock, S. Haupt, P. G. Wallker, S. D. A. Pont, J. McNicol, L. Cardle, J. Morris, R. Viola, R. Brennan, P. E. Hedley and M. A. Taylor. 2007. Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds. *J. Expt. Bot.* 58:1035-1045.

Mielke, E. A. and F. G. Dennis. 1978. Hormonal control of flower bud dormancy in sour cherry (*Prunus cerasus* L). Effects of leaves defoliation and temperature on

- levels of abscisic acid in flower primordia. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100:287-290.
- 望岡亮介・東部光伸・堀内昭作・尾形凡生・塩崎修志・河瀬賢次・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. *園芸雑.* 65:49-54.
- 森元福雄・熊代克己. 1978. 薬剤処理による落葉果樹の休眠打破に関する研究. *信州大農紀要.* 15:1-17.
- Nakano, M., E. Yuda and S. Nakagawa. 1980. Studies on rooting of the hardwood cuttings of grapevine, cv. 'Delaware'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 48:385-394.
- Nigond, J. 1967. Reserches sur la dormance des bourgeons de la vigne. *Ann. Physiol. Veg.* 9:397-414.
- Noriega, X., B. Burgos and F. J. Pérez. 2007. Short day-photoperiod triggers and low temperatures increase expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzyme activity in grapevine buds. *Phytochemistry.* 68:1376-1383.
- 農林水産省果樹試験場. 1994. 育成系統適応性検定試験・特性検定試験調査方法. 105.
- Okada, K., N. Tonaka, Y. Moriya, N. Norioka, Y. Sawamura, T. Matsumoto, T. Nakanishi and T. Takasaki-Yasuda. 2008. Deletion of a 236 kb region around *S₄-RNase* in a stylar-part mutant *S₄sm*-haplotype of Japanese pear. *Plant Mol. Biol.* 66:389-400.
- Pan, J., S. Fujioka, J. Peng, J. Chen, G. Li and R. Chen. 2009. The E3 ubiquitin ligase SCFTIR1/AFB and membrane sterols play key roles in auxin regulation of endocytosis, recycling, and plasma membrane accumulation of the auxin efflux transporter PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 21:568-580.
- Petri, J. L. and F. Herter. 2002. Nashi pear (*Pyrus pyrifolia*) dormancy under mild

- temperate climate conditions. *Acta Hort.* 587:353-361.
- Petri, J. L., G. B. Leite and Y. Yasunobu. 2002. Studies on the causes of floral bud abortion of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) in Southern Brazil. *Acta Hort.* 578:375-380.
- Powell, L. E. 1987. Hormonal aspects of bud and seed dormancy in temperate-zone woody plants. *HortScience.* 22:845-850.
- Prassions, C., S. Rigas, D. Kizis, A. Vlahou and P. Hatzopoulos. 2011. Subtle proteome differences identified between post-dormant vegetative and floral peach buds. *Journal of proteomics.* 74:607-619.
- Ramagli, L. S. and L.V. Rodrigez. 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis.* 6:559-563.
- Rathore, D. S. 1991. Pears. p.123-178. In: S. K. Mitra, T. K. Bose and D. S. Rathore (eds.). *Temperate fruit.* Hort. Allied Publishers, Cakutta.
- Richardson, E. A., S. D. Seely and D. R. Walker. 1974. A model for estimating the completion of rest for 'Redheaven' and 'Elberta' peach trees. *HortScience.* 9:331-332.
- Rodriguez, J., W. B. Sherman, R. Scorza, M. Wisniewski and W. R. Okie. 1994. 'Evergreen' peach, its inheritance and dormant behavior. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:789-792.
- 斎藤寿広・佐藤義彦・澤村 豊・正田守幸・壽 和夫. 2002. ナシの自家和合性品種育成に関する研究 (第2報). 'おさ二十世紀'由来の S₄sm 遺伝子を持つ花粉の特性. *園学雑.* 75 (別) 2:123.
- 佐藤義彦・栗原昭夫・安部和幸・緒方達志・梶浦一郎・壽 和夫・町田 裕. 1988.

- ニホンナシにおける自家和合性の遺伝様式の解明. 園学要旨. 昭 63 秋:76-77.
- Saure, M. C. 1985. Dormancy release in delicious fruit trees. Hort. Rev. 7:239-300.
- Sawamura, Y., T. Saito, N. Takada, T. Yamamoto, T. Kimura, T. Hayashi and K. Kotobuki. 2004. Identification of parentage of Japanese pear 'Housui'. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 73:511-518.
- Seeley, S. D. and L. E. Powell. 1981. Seasonal changes of free and hydrolyzable abscisic acid in vegetative apple buds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106:405-409.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm and M. Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Analytical chemistry. 68: 850-858.
- Shulman, Y., G. Nir, L. Fanberstein and S. Lavee. 1983. The effect of Cyanamide on the release from dormancy of grapevine buds. Scientia Horticulturae. 19: 97-104.
- Sterrett, J. P. and P. H. Hipkins. 1980. Response of apple buds to pressure injection of abscisic acid and cytokinin. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105:917-920.
- Sugiura, T. and H. Honjo. 1997. A dynamic model for predicting the flowering date developed using 0an endodormancy break model and a flower bud development model in Japanese pear. J. Agric. Met. 52:897-900.
- 田村文男・田辺賢二・伴野 潔. 1992. 低温処理がニホンナシ '二十世紀' の芽の休眠の深さ, 呼吸及び内生成長調節物質に及ぼす影響. 園学雑. 60:763-769.
- 田村文男・田辺賢二・池田隆政. 1993. ニホンナシ '二十世紀' の芽の休眠の深さとABAとの関係. 園学雑. 62:75-81.
- Tamura, F., K. Tanabe and A. Itai. 1995. Effect of interruption of chilling on bud break in Japanese pear. Acta Hort. 395:135-140.

- Tamura, F., K. Tanabe and M. Katayama. 1996. Characteristics of mitochondrial particles in relation to flooding tolerance in pear rootstocks. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65:1-5.
- Tamura, F., K. Tanabe and A. Itai. 1997. A model for estimating rest completion for ‘Nijisseiki’ pear. Environment Control in Biol. 35:185-189.
- Tamura, F., K. Tanabe, A. Itai and H. Tanaka. 1998. Protein changes in the flower buds of Japanese pear during breaking of dormancy by chilling or high-temperature treatment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123:532-536.
- Tamura, F., K. Tanabe, A. Itai and M. Morimoto. 2001. Variation in the chilling requirement for breaking leaf bud endodormancy in wild pear species and pear cultivars. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70:596-598.
- 田村文男. 2009. 身近な野菜・果物～その起源から生産・消費まで (10) ニホンナシ (I) . 日本食品保蔵学会誌. 35:315-321.
- 田辺賢二・田村文男・板井章浩・林 真二. 2001. ニホンナシ新品種 ‘秋栄’, ‘瑞秋’ および ‘真寿’ の特性について. 園学雑. 70 (別) 1:220.
- 谷口弘行・山本 仁・坂川和也. 2006. 温度・施設加温栽培がニホンナシ自発休眠導入に与える影響. 福井農試研報. 43:20-27.
- 東部光伸・望岡亮介・堀内昭作・尾形凡生・塩崎修志・黒岡 浩. 1998. ブドウの芽の自発休眠誘導に対するグルタチオンの役割. 園学雑. 67:912 - 916.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance gene and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol. 50:571-599.
- Thompson, M. M., D. C. Smith and J. E. Burgess. 1985. Non-dormant mutants in the temperate tree species, *Corylus avellana* L. Theor. Appl. Genet. 70:687-692.
- Ubi, B. E., D. Sakamoto, Y. Ban, T. Shimada, A. Ito, Y. Takemura, F. Tamura, T. Saito

- and T. Moriguchi. 2010. Molecular cloning of dormancy-associated MADS-box gene homologs and their characterization during seasonal endodormancy transitional phases of Japanese Pear. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135:174-182.
- Uemura, M. and P. L. Steponkus. 1994. A Contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol.* 104:479-496.
- Uemura, M., R. A. Joseph and P. L. Steponkus. 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol.* 109:15-30.
- van Dyk, M. M., M. K. Soeker, I. F. Labuschagne and D. J. G. Rees. 2010. Identification of a major QTL for time of initial vegetative budbreak in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Tree Genet. Genom.* 6:489-502
- Wan, C-T. and T. Wilkins. 1994. A modified Hot Borate significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal. Biochem.* 1:7-12.
- Wang, S. Y., M. Faust and G. L. Steffens. 1985. Metabolic changes in cherry flower bud associated with breaking of dormancy in early and late blooming cultivars. *Physiol. Plant.* 65:89-94.
- Wanner, L. A. and O. Junttila. 1999. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120:391-400.
- Werner, D. J. and W. R. Okie. 1998. A history and description of the *Prunus persica* plant introduction collection. *HortScience.* 33:787-793.
- Westwood, M. N. and N. E. Chestnut. 1964. Rest period chilling requirement of Bartlett pear as related to *Pyrus calleryana* and *P. communis* root stock. *Proc. Amer. Soc.*

- Hort. Sci. 81:82-87.
- Westwood, M. N. 1978. Temperate-Zone POMOLOGY. p.199-303. W. H. Freeman and Co. New York.
- White, A. 2002. Asian pear production and research trends in New Zealand and Australia. Acta Hort. 587:107-111.
- Yamamoto, R. R., A. H. Katsumi, M. Yoshida, Y. Sekozawa, S. Sugaya and H. Gemma. 2010. "Floral primordia necrosis" incidence in mixed buds of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nakai var. *culta*) 'Housui' grown under mild winter conditions and the possible relation with water dynamics. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 79:246-257.
- Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, T. Manabe, K. Kotobuki, T. Hayashi, Y. Ban and N. Matsuta. 2002a. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. Euphytica 124:129-137.
- Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta. 2002b. Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Mol. Ecol. Notes. 2:14-16.
- Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, T. Imai, T. Saito, Y. Sawamura, K. Kotobuki, T. Hayashi and N. Matsuta. 2002c. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. Theor. Appl. Genet. 106:9-18.
- 山根久代・笥 永子・岩本和也・森 仁志・田尾龍太郎・片岡郁雄. 2003. ウメ休眠芽に存在する dehydrin 様タンパク質の発現. 園学雑. 72 (別) 1:71.
- Yamane, H., Y. Kashiwa, T. Ooka, R. Tao and K. Yonemori. 2008. Suppression subtractive hybridization and differential screening reveals

endodormancy-associated expression of an SVP/AGL24-type MADSbox gene in lateral vegetative buds of Japanese apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133:708-716.

Yooyongwech, S., S. Sugaya, Y. Sekozawa and H. Gemma. 2009. Differential adaptation of high- and low-chill dormant peaches in winter through aquaporin gene expression and soluble sugar content. *Plant Cell Rep.* 28:1709-1715.

本研究の基礎となる論文リスト

1) 竹村圭弘・須藤幸子・池田隆政・松本和浩・田村文男. 2011.

ニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の芽の自発休眠は低温によって導入される.

園芸学研究. 10:87-92

第2節を構成

2) 竹村圭弘・黒木克翁・松本和浩・森口卓哉・中田 昇・田村文男. 2012.

ニホンナシ系統 TH3 と少低温要求性タイワンナシ横山の F₁ における自発休眠特

性. 園芸学研究. 11:181-187

第5節を構成