

# ニホンナシの凍霜害発生機構と その防止法に関する研究

瀬古澤 由彦

(筑波大学農林学系)

Study on the mechanisms of frost injury occurrence and the preventing  
techniques in Japanese pear

Yoshihiko Sekozawa

Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tennodai,  
Tsukuba 305-8572, Japan

## 目 次

第1章 緒言 .....	2
第2章 ニホンナシ‘幸水’のハードニング・デハードニング過程における 低温耐性の変化と物質変化 .....	6
第3章 ニホンナシ‘幸水’の花器および幼果の低温耐性 .....	15
第4章 ニホンナシ‘幸水’花芽, 花器の凍結様式 .....	19
第5章 ニホンナシ‘幸水’の花器および幼果におけるジャスモン酸関連物質 PDJ処理による晩霜害回避の可能性 .....	28
第6章 総合考察 .....	35
摘要 .....	43
謝辞 .....	44
引用文献 .....	44
Summary .....	51

## 第1章 緒言

果樹栽培において開花期や果実肥大初期における春先の低温は、果実生産に深刻な被害を与える。霜害とは、夜間から早朝にかけて急激に温度が下がることによって生ずる農作物の被害のことであり、植物生理学的には低温による細胞の凍死によるものである。春季に起きる霜害を晩霜害といい、秋季のものを初霜害または早霜害という。果樹栽培の適地を選定する際の措置として、その土地の年平均気温が適当であり、また果実が成熟するのに必要な積算温度が十分に恵まれていても、発芽期または開花期前後に襲う異常低温、すなわち晩霜の発生の有無が重要な点になる。霜害による作物の被害は、わずかな地形、建造物などの地物の影響で著しい差がでる場合が多い。放射冷却により地面が冷却すると、地面付近の気温が上層の気温より低い逆転型の温度分布になり、重たい冷気は滞留しやすく、くぼ地などでは被害が著しくなる（内島，1986）。したがって、栽培適地の選定は十分吟味する必要がある。茨城県においても過去、晩霜害がたびたび発生し、ニホンナシの生産に大打撃を与えている。1987年の幸水では56.7%の花器が傷害を受け、1989年には20%のくず果が発生した（関東農政局茨城統計事務所，1990）。花が被害を受けると落花し、着果したものでも奇形果の発生や品質低下により商品性が無くなってしまう。

植物は季節やその生育段階によって低温耐性（hardiness）が変化するとされており、ニホンナシを含む果樹では花蕾期や開花期、そしてその後の幼果結実期が低温に対して感受性が強い（小林，1985）。したがって、降霜時における傷害発生の有無は、果樹の生長周期と深い関係があるといえる。そのため、霜害を受けやすい果樹の種類や品種は固定されたものではなく、また栽培地によっても左右される。一般的に発芽や開花の早いものほど霜害を受ける確率が高い。農家における実際の生産現場においては、低温による開花期の花、および果実肥大初期の被害が晩霜害の主たるもの

である。その被害時期を回避することやその軽減対策は、果樹園芸において重要な課題である。

植物は自然条件下では、秋から冬にかけて低温にさらされることにより低温耐性を高めていき（ハードニング，hardening）、反対に温度の上昇とともに獲得した低温耐性を失っていく（デハードニング，dehardening）。植物の低温耐性を理解する上で、その過程における代謝の変化やその制御機構、また環境要因との関係などを明らかにすることが重要である。そこで本研究では、まず自然条件下でニホンナシ‘幸水’の低温耐性に関係すると考えられる、内生物質の消長について検討を行った。次に低温耐性と植物内の水分状態との関係を解明するために、季節の変化に伴う低温耐性と水分含量の変化を測定した。

凍結傷害の要因として、細胞外の氷晶形成による水分ストレス（第1図）が挙げられる。氷晶形成は細胞外の水ポテンシャルを下げ、細胞は脱水ストレスをうける。細胞外凍結による脱水の程度は、凍結温度と細胞内の浸透濃度に依存し、温度が低いほど細胞はより大きな脱水ストレスを受ける（占田，1999）。一方、細胞外凍結（extracellular freezing）による脱水があまり進まないうちに細胞が急速に冷却されると、細胞内が凍結する。この現象を細胞内凍結（intracellular freezing）といい、細胞内凍結を起こした細胞は生存できない。ハードニング中の低温耐性の増大と対応して細胞の浸透濃度が高まるといわれている（酒井，1982）。細胞内で浸透圧を調節している溶質としては糖やアミノ酸、またそれらの関連物質が考えられ、本

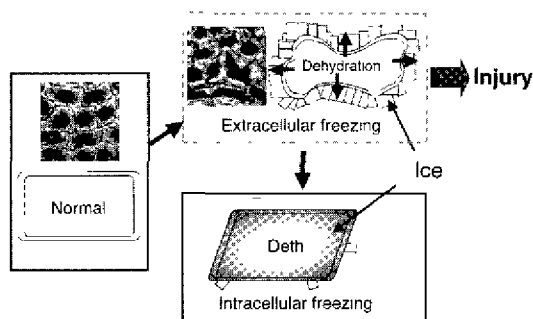


Fig. 1. Freezing events in plant cells

研究では溶質の種類およびその量について調査した。

糖はハードニング過程で蓄積し、それに平行して細胞の浸透濃度が増加する。細胞は凍結する際、まず原形質分離した後、次第に凍結脱水されるが、これらの物質は細胞内の濃度を高めるので凍結脱水の程度が緩和される。このように糖や糖アルコールは高い凍結防御効果を示す一方、プロリンを含む遊離アミノ酸も糖と同様に凍結防止剤としての機能がある (Withers・King, 1979)。また植物細胞は水分の急激な減少などのストレスに対して、大量の糖 (Sasakiら, 1998) やプロリンなどのアミノ酸を合成する (Bohnertら, 1995) ことも知られており、アミノ酸プールをつくることにより浸透圧調節を行っているものと考えられる。黒田ら (1991) は、低温耐性と過酸化物質代謝とが密接に関係していることを報告している。活性酸素消去物質としてトコフェロールやアスコルビン酸などが機能するが、またポリアミンも活性酸素を消去する可能性があると考えられている (Larcher, 1999; 佐治, 1999)。ポリアミンはアミノ基を2つ以上持つ直鎖の炭化水素で、生体内に普遍的に存在し、核酸の安定化、タンパク質合成の活性化、物質の膜透過性の促進などの多彩な生理機能を持つとされており、さまざまなストレス条件下において増加し、植物のストレス耐性にも関与していると考えられている。しかしストレス耐性におけるポリアミンの作用機構についてはまだよくわかっていない。

一方、これまでストレスに関与する植物ホルモンとしては、アブシシン酸 (ABA) が広く研究されている。ABAはワタの実の離層形成や樹木の芽の休眠を促進する物質として発見され、蒸散の抑制、老化促進など生長抑制ホルモンとしての作用が解明されてきた。またABAは、水ストレスや低温ストレスなどの環境ストレスに対する植物の耐性に関わっていると報告されている (近藤, 1994)。しかしそのようなストレス耐性に対するメカニズムには現在においても不明な点が多い。植物が低温にさらされることにより、低温耐性を獲得するハードニングについては、以前から数多

く報告されており、ABAの関与が示唆されている。例えばシロイヌナズナのハードニングとABA含量には相関がみられ、内生ABA含量を増加させることが知られている乾燥処理によっても低温耐性が高まった (Langら, 1994)。さらに低温処理の代わりにABA処理によって低温耐性を獲得することが、シロイヌナズナやbromgrass (チャヒキ) で知られている (Taninoら, 1990; Ishikawaら, 1995; Mantylaら, 1995)。しかし、植物の低温耐性獲得および消失の機構や植物の凍結機構、また凍結傷害の機構については解明されていない部分が多い。

晩霜害による凍結傷害の詳細を知るためには、シミュレーションをしてその発現様式を明確にする必要がある。植物の凍結を計測する方法には、熱電対などを用いた示差熱分析法 (Ashworthら, 1985a, b; Kangら, 1998; Quammeら, 1972, 1995) や顕微鏡による観察 (Quamme, 1978; Ashworthら, 1989) が以前から行われており、最近になって赤外線サーモグラフィ (infrared video thermography) やNMR spectrometry (核磁気共鳴分光法) を使った観察 (Priceら, 1997a, b; Ishikawaら, 1997, 2000) などが行われてきている。これまでの研究報告では、植物の凍結機構、また凍結傷害の機構についてシミュレーションする際、凍結試験後の傷害の様子からその傷害過程の全体像を推論してきた。しかし、赤外線サーモグラフィは凍結時の潜熱の放出を計測でき、植物表面の温度のみであるが非接触で測定できるため、機器計測としては有効であると考えられる。これまで本機を用いてモモ、リンゴ、セイヨウナシ (Wisniewskiら, 1997) やクランベリー (Workmasterら, 1999)、クロフサスグリ (Carterら, 1999, 2001) における報告はあったが、ニホンナシについての知見は全く無かった。本研究では赤外線サーモグラフィを使用して、ニホンナシの花器における凍結の過程を観察した。

氷核活性 (ice nucleation activity) を持つ物質に関する研究の歴史は長く、初めに氷核活性を持つことが報告されたヨウ化銀 (Vonnegut, 1947) は人工降雨のための氷核として用いられている。

その後様々な氷核活性物質が報告され、自然界における氷核活性についても明らかになってきた。霜害に氷核活性細菌が関わっていることが明らかになったのは、比較的最近のことである (Schnell・Vali, 1972)。その後ハンノキの落ち葉から単離された *Pseudomonas syringae* が、 $-1.8 \sim -3.8^{\circ}\text{C}$  の氷核活性を示す氷核細菌であることが確認され、氷核細菌が霜害に大きく関わっていることが明らかにされてきた (Ashworth, 1992; 荒田, 1998)。氷晶の形成は凍結傷害の前提条件であり、植物が氷点下での生存するために避けることができない過程であり、低温耐性の獲得において重要な要因である (Rodrigo, 2000)。低温耐性がある植物は、細胞や組織にとって致命的な細胞内凍結を避けるために、その種や器官、組織ごとに特徴的な凍結様式を持っている (Ishikawa・Sakai, 1981)。この凍結パターンの制御は植物の低温耐性獲得にとって重要な機構である。植物において氷晶を形成する要因の一つは氷核活性細菌であるが、最近になって低温耐性のある植物は細胞壁や細胞内に氷核形成物質を持っている可能性が示唆された。非細菌性の氷核活性がモモの枝 (Ashworth, 1985a; Grossら, 1988)、ツツジの鱗片 (Ishikawa ら, 1992; Ishikawaら, 2000)、冬コムギの葉 (Brushら, 1994) の組織において報告されている。植物における氷核形成の要因としては、植物自身が持っている内生的要因、および表面に着生している細菌などの外生的要因の両方が考えられており、越冬する植物において観察された氷核活性はそれらを合計した氷核の形成しやすさとして表されている (Brushら, 1994)。しかし、植物組織における氷核活性には未解明な部分が多く、またニホンナシの凍霜害と氷核活性との関連を報告した例は無いため、ニホンナシの花芽および花器における氷核活性を調査する必要があると考えた。

ところで一方、晩霜による被害を回避するためには、発生の可能性がある危険地帯での栽培を避けることや、低温耐性が強く、開花期が降霜時期と重ならず晩霜の被害にあいにくい果樹や品種を栽培するなどの栽培的対策がまず挙げられる。ま

た最近では気象予報技術の進歩や局地的冷却現象解析法の発達 (高山ら, 1999) により、数日前から霜害発生の予報をもとに気象的防除技術として寒冷紗による被覆、ファンによる送風やスプリンクラーによる散水 (氷結法)、また燃料を燃焼させることなどの、周囲の微気象を調節することによる防止法が一般的に行われている。被覆法は作物体を被覆することにより、被覆内気温の低下を防ぐとともに、被覆内作物の放射冷却を防止することを目的とした方法である。被覆労力に難点はあるが、経営面積の大きい諸外国に比べ我が国の果樹栽培では非常に有効である。

凍霜害の発生時には一般的に放射冷却が強まり、気温は急速に低下していく。このような条件下では気温の逆転層が形成され、樹冠付近と地上 10m 付近では  $3 \sim 4^{\circ}\text{C}$  の温度差ができる。そして花器や葉温はその周囲の気温よりもさらに  $1 \sim 2^{\circ}\text{C}$  低くなりやすい (小中原, 1988)。送風法は上層の暖気を攪拌混合し、樹冠付近の温度を暖める方法である。しかし、ファンによる送風は著しい低温の際、物理的に周囲の空気温度以上には植物体の温度を上げることはできない。また散水・氷結法は水が結氷する際に  $1\text{g}$  につき  $80\text{cal}$  の潜熱を放出する現象を利用して、スプリンクラーにより連続的に植物体へ散水する方法である。理論的にはきわめて優れているがスプリンクラーの設置にはコストが非常にかかり、また散水する水の量も莫大となり実用例はあまり多くない (Nesbittら, 2000)。燃焼法は、以下の2点を期待して行われる方法である。(1)燃料を燃焼させて気温を暖め、また(2)熱源から発生する放射エネルギーを直接植物体に吸収させて体温を暖める。しかし、一般的に行われていた古タイヤの燃焼は、経済性や環境負荷の点から今後は難しいとされる。

このように以前から凍霜害の防止には数々の施策が為されてきたが、晩霜の発生は自然現象であるために完全に防ぐことは困難な場合が多い。そのような状況で植物成長調節物質による被害の軽減を目的とした研究も行われている。例えば、晩霜害発生後、ジベレリン処理によって単為結果できることも明らかになっている (猪俣ら, 1992)。

が、生産される果実は品質が悪く、一部には生理障害も発生してしまう。

植物成長調節物質の一つであるジャスモン酸 (jasmonic acid) は、植物界に広く分布し、低濃度でABAと似た作用を持ち最近注目を集めている (Sembdner・Parthier, 1993; Creelman・Mullet, 1997a, b; 竹内・禿, 1997)。ジャスモン酸はニガヨモギの茎葉部よりジャスモン酸メチルエステルが単離、同定され芳香成分として親しまれ、その後植物におけるジャスモン酸、およびその関連化合物の生理作用が明らかにされてきた。ジャガイモ塊茎における細胞伸長作用 (Takahashiら, 1994) やソラマメ種子の生長抑制 (Datheら, 1981)、オートムギ第一葉におけるクロロフィル分解 (Uedaら, 1981)、ゴガツサゲにおける離層形成の促進 (上田, 1995)、トマト果実のエチレン生成の促進 (Saniewskiら, 1987ab) などが挙げられる。また傷害刺激の伝達シグナル物質として役割も報告されており (Seoら, 1997, 1999)、植物の生理現象に深く関わっていることも明らかにされつつある。このように植物ホルモンなどの植物成長調節物質は、農業分野において生産性および品質の向上の目的で、近年広く利用されるようになってきており、果樹生産の発展にも大いに役立っている。

ジャスモン酸は上述したようにABAと似た生理作用を示し、また傷害ストレスに対する応答にも関わっているため、低温によるストレスに対しても有効に働く可能性がある。ズッキーニへのジャスモン酸のメチルエステル体であるジャスモン酸メチル処理は低温障害を緩和し (Wang・Buta, 1994; Gonzalez-Aguilarら, 2000; Dingら, 2001, 2002)、*n*-Propyl dihydrojasmonate (PDJ) 処理

したカンキツでも低温による落葉や果実の落下が緩和されている (Fujisawaら, 1997)。ジャスモン酸の処理により内生ABA含量が増加することもズッキーニ、カキ、モモ、ブドウなど果実で認められている (Wang・Buta, 1994; Gemmaら, 1998; 小橋, 1998; 東川, 1998)。このようにジャスモン酸がABAを介して低温ストレスに対し関与している可能性があり、低温耐性獲得の機構にも関与する可能性が考えられた。そこで本研究はジャスモン酸処理による晩霜害回避が可能であるかどうかについても検討した。

以上のように第2章ではハードニング・デハードニング過程における低温耐性の変化と物質変化を検討し、第3章ではニホンナシ‘幸水’の花器および幼果の低温耐性に言及して、第4章ではニホンナシ‘幸水’花芽、花器の凍結様式を調査した。これらは植物のストレス耐性について重要な知見を提供し、植物の低温耐性の獲得機構における研究の進展に対しても寄与し得ると考える。さらに第5章では晩霜害防止法の一つとして、ニホンナシの低温耐性におけるジャスモン酸の作用機構を解明しようとした。そして果樹栽培の現場において重要な課題である晩霜の回避についてもジャスモン酸が有効な手段になり得ると思われる。また、ジャスモン酸-ABA-低温耐性の関係を検討することは、植物のストレスに対する反応機構を解明する上での一助になり得ると考えられるので、この点についても検討した。

本研究は、筑波大学大学院博士課程農学研究科の学位論文研究として行われた研究であり、研究内容の一部については学会誌等に掲載されている (瀬古澤・弦間, 2003; Sekozawaら, 2002, 2003, 2004)。

## 第2章 ニホンナシ‘幸水’のハードニング・デハードニング過程における低温耐性の変化と物質変化

### 2-1 緒言

植物は季節やその生育段階において低温耐性を変化させるといわれており、特に永年性の木本植物では、秋から冬にかけて低温耐性を著しく高めていくが、それに対応して代謝系や細胞の構造、および成分が著しく変化する(酒井, 1982; Larcher, 1999)。秋から冬にかけての低温耐性増大を伴う一連の変化を低温順化(ハードニング)と総称し、反対に冬から春にかけての低温耐性減少の過程を脱順化(デハードニング)としている。

生物の多くは、一般に水分含量が低く、細胞液の浸透濃度が高いほど低温耐性があり(酒井, 1982; Larcher, 1999)、細胞中の溶質の変化が植物の凍結様式および低温耐性に強く影響を与えると考えられている(酒井, 1982; Larcher, 1999)。

そこでこの章では、秋から春にかけてのニホンナシ‘幸水’における低温耐性の変化を調査した。さらに、花芽の水分含量、糖、アミノ酸などの溶質、および低温耐性に関係するといわれる植物ホルモンであるABA(Guyら, 1992; Langら, 1994; Mantylaら, 1995)の変化について調査をおこない低温耐性との関連を検討した。

### 2-2 ニホンナシ‘幸水’のハードニング・デハードニングにおける低温耐性の変化

#### 2-2-1 材料および方法

ニホンナシ‘幸水’の成木を用いて、冬から春にかけて低温耐性の変化と水分含量との関係を調査した。筑波大学農林技術センター栽植の20年生ニホンナシ‘幸水’成木から、1999年2月1日よりほぼ2週間ごとに発育枝を採取した。花芽を切り取った後、節部分を除き1 cm長に切りそろえ、枝を縦に4分割し、ジン皮部(bark)と材部(wood)に分離した(第2図)。

試料をアルミホイルで包み、5℃、0℃でそれ

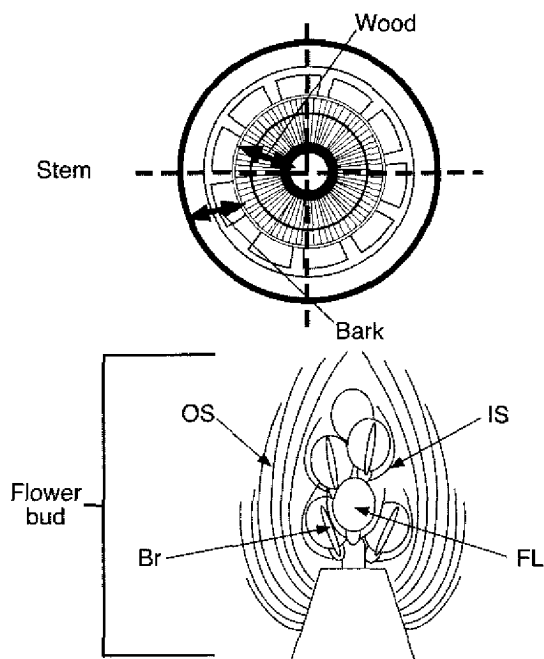


Fig. 2. Diagram of stem (upper); bark and wood tissues, and flower bud component organs (lower): outer scale (OS), inner scale (IS), floret (FL) and bract (Br) of ‘Kousui’ Japanese pear.

ぞれ30分ずつ予冷した後、5℃/hの冷却速度で冷却し、1時間ごとに試料を取り出しながら、最終温度の-20℃まで試験を行った。凍結試験はエタノールを張った水槽に投げ込み式のパイプヒーター(B型投込みヒーター、八光電気製作所)、クールパイプ(cool EC-80, TOKYO RIKAKIKIKAI)およびサーモスタット(SR-31, YAMATO)を設置して温度を調節して行った。傷害をうけた細胞は、細胞内のイオンやアミノ酸が溶媒中で拡散するので、組織を水で浸出し、その液の電気伝導度を測定して組織の相対的な被害度を知ることができる(Dexterら, 1932; Lim・Arora, 1998; Pellet・Heleba, 1998)。そこで電解質漏出率を測定して被害の大きさ、すなわち低温耐性の程度の評価を行った。凍結試験を終えた試料は氷水中で融解し、その後5℃で一晩おいた後の試料に蒸留水を加え、24時間後、電気伝導度計(CM-30ET, 東亜科学)で浸出液の電解質漏出量(C1)

を測定し、さらに30分間煮沸して組織を崩壊させてから一晩おき、再び浸出液の電解質漏出量を測定した (C2)。電解質漏出率 (ion leakage) は次の式により求めた。

$$\text{電解質漏出率 (\%)} = C1/C2 \times 100$$

水分含量は採取した試料の生体重 (FW) を測定後、60℃のオープンで3日間、乾燥させて乾物重 (DW) を測定し両者の比より求めた。

$$\text{水分含量 (\%)} = (FW - DW) / FW \times 100$$

電解質漏出率の測定は6芽、水分含量の測定は3芽ずつ行った。

また同様に2000年10月から2001年4月まで花芽 (第2図) を採取し、試料とした。5℃、0℃でそれぞれ30分ずつ予冷した後、2℃/hの冷却速度で-5、-10、-15、-20℃まで冷却した。設定温度に達した時点で、それぞれ氷水中で30分間、ゆっくりと融解し、5℃で一晩おいた後、同様に電解質漏出率を測定した。測定はそれぞれ5芽ずつ行った。

## 2-2-2 結果および考察

1999年の冬季から春季にかけての気温の変化を第3図に、デハーディング中のニホンナシ '幸水' の発育枝から採取した花芽、枝のジン皮部、材部における電解質漏出率の経時的変化を第4、5図に示した。花芽においては、本実験の最低温度である-20℃に遭遇させた区で、気温が上昇し始める3月に入ると電解質漏出率が大きくなり、その後3月中旬に入ると急激に増大した (第4図)。そして他の温度区においても、より低温の区から順に電解質漏出率が増大する傾向を示した。特に4月21日の満開日以降の花芽では、比較的0度に近い氷点下の温度区である-5℃に遭遇しても漏出率が非常に大きく、被害の程度が著しかった。

ジン皮部においては花芽と同様に、3月中旬において最も低い温度である-20℃に遭遇した区が大きくなり、遅れて-15℃に遭遇した区でも増大し始めた (第5図-A)。しかし、それ以外の温度では花芽ほど顕著な増大傾向は無かった。

材部においては測定を開始した2月上旬から、電解質漏出率がわずかに増大する傾向を示した

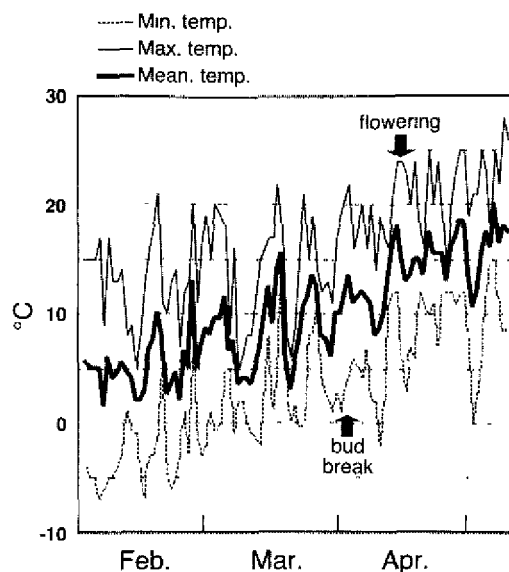


Fig. 3. Change in air temperature during the experiment in 1999

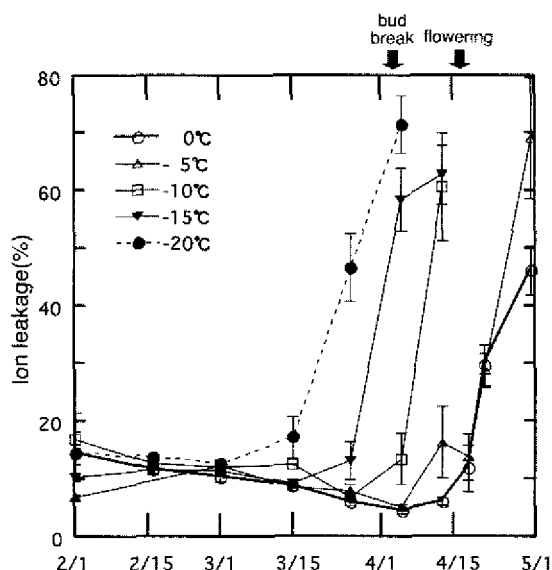


Fig. 4. Change in cold tolerance of flower bud of 'Kousui' Japanese pear during dehardening as expressed by ion leakage in 1999. Vertical bars represent standard error (S.E., n=6)

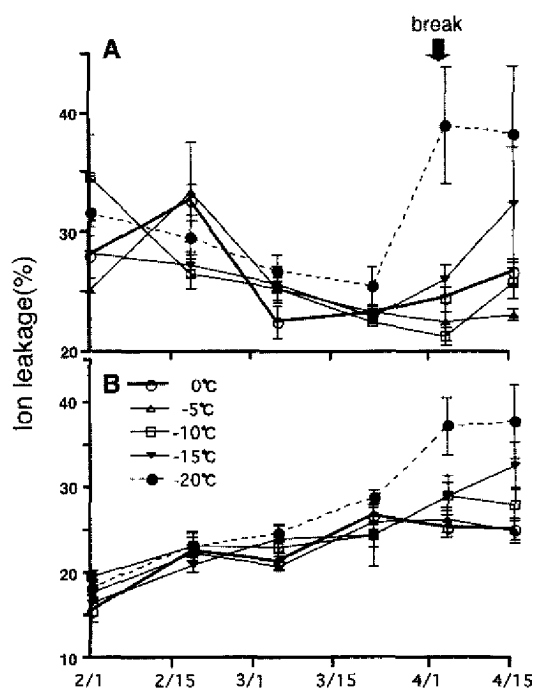


Fig. 5 Change in cold tolerance during dehardening of bark (A) and wood (B) in a stem of 'Kousui' Japanese pear as expressed by ion leakage in 1999. Vertical bars represent S.E. (n=6)

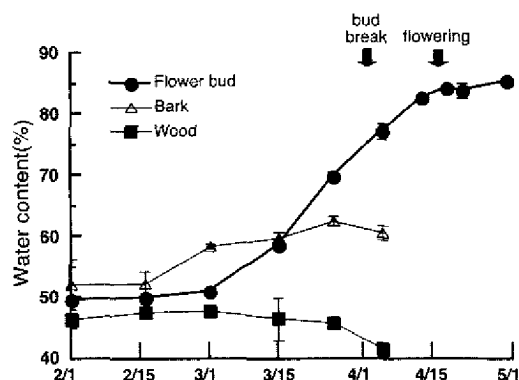


Fig. 6. Change in water contents in flower bud, bark and wood of 'Kousui' Japanese pear in 1999. Vertical bars represent SE (n=3)

(第5図-B). その傾向は温度が上昇し始めた3月に入っても変わらず同様の傾向であり、花芽に比べて急激に漏出率が増大するようなことはなかった。

水分含量の経時的变化を第6図に示した。測定開始後、まずジン皮部において2月中旬にやや増加する傾向がみられたが、3月以後はジン皮部ではほぼ横這いの傾向であった。花芽においてはジン皮部に遅れて3月上旬より急激な増加がみられ、花の開花する4月の中旬までその増加が続いた。一方、材部において水分含量は3月中旬まではあまり変化はみられず、その後若干減少する傾向を示した。

以上のように電解質漏出率からみた低温耐性を比較すると、気温が上昇を始める前である2月においてはジン皮部が最も低温耐性が弱く、材部は2月初めから低温耐性が弱くなる傾向を示した。気温が上昇しデハードニングが始めると、花芽の低温耐性は急激に弱くなり、ジン皮部、材部の低温耐性の消失は花芽に比べると穏やかであった。そして開花期では花芽が最も低温耐性が弱く、晩霜によって花芽が最も被害を受ける確率が高いことと一致した。

2000年度におけるハードニング～デハードニング間の花芽の低温耐性の変化を第7図に示した。10月中旬においては $-5^{\circ}\text{C}$ の低温でも若干の傷害がみられ、 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下では著しく電解質漏出率が高く、低温による傷害が著しかった。その後気温が低下するに伴い、植物がハードニングされるにともなって、凍結試験時の花芽の電解質漏出率は低下していき、12月には $-20^{\circ}\text{C}$ の低温遭遇後も傷害の様子は見られなく、翌年の3月中旬まで高い低温耐性を保った。その後気温が上昇するに伴いデハードニングが始まり4月になると再び電解質漏出率が上昇し始め、低温耐性の低下が確認された。

花芽の水分含量および生体重、乾物重の経時的变化を第8図に示した。ハードニング中の低温耐性の増大がみられた時期に水分含量が若干減少していた。その後2月より増加の傾向がみられ、花の開花する4月までその急激な増加が続いた。



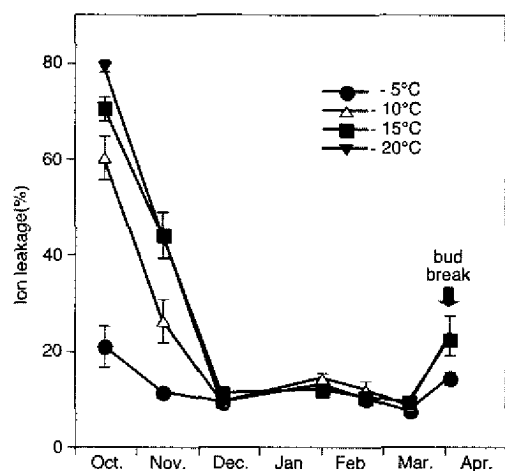


Fig. 7. Change in cold tolerance during dehardening of flower bud of 'Kousui' Japanese pear as expressed by ion leakage in 2000-2001. Vertical bars represent S.E. (n=5)

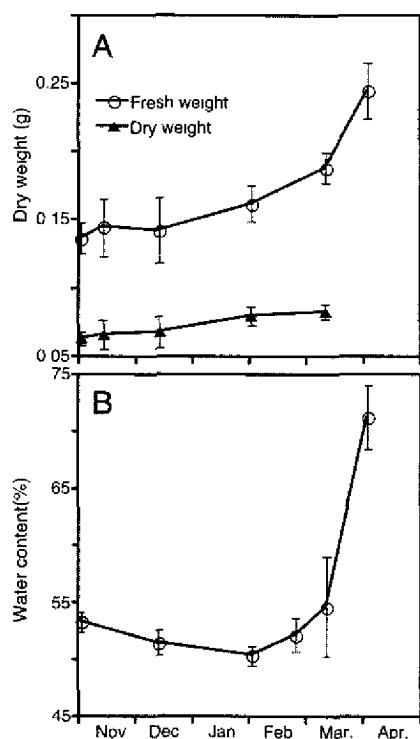


Fig. 8. Change in fresh and dry weight (A) and water content (%) (B) of flower bud of 'Kousui' Japanese pear during hardening and dehardening. Vertical bars represent S.E. (n=5)

乾物重はハードニング～デハードニングを通して増大した。

一般的に植物は厳冬期よりも気温が上昇し、代謝活性が活発になるにつれて低温に対する耐性が無くなっていく。ニホンナシについては、Liaoら(1996, 1997)が「二十世紀」において花の生長ステージと低温耐性の関係について報告している。これによると花芽の低温耐性は1, 2月が最も高く、花芽が膨らみ始める3月ごろから低温耐性が失われはじめ、鱗片が脱離し開花すると急激に低温耐性が失われると報告している。今回のニホンナシ「幸水」における試験でも同様の傾向がみられ、気温が上昇し始める3月に入り、花芽における代謝活性がしだいに活発になると急激に低温耐性が弱まった。特に花が開花した以降では、0℃でも著しい被害を受けた。花芽における電解質漏出率の経時的変化と水分含量の変化を比較すると、その上昇し始める時期がほぼ一致しており、生体内における水分含量が低温耐性と強く関係していることが今回の実験においても示唆された。カキにおいてKangら(1998)が報告しているように、芽における水分含量は芽(新梢)の伸長量とほぼ対応しており、ニホンナシ「幸水」においても芽の伸長生長が始まり、水分含量の増加とともにすみやかに低温耐性が失われることが確認できた。

しかし、ジン皮部、材部においては花芽に比べ、水分含量と低温耐性の間に明瞭な関係は確認できなかった。今回の実験において、ジン皮部の水分含量の増加は花芽より早い時期に起きたが、低温耐性が失われ始めるのは花芽に遅れて起きており、水分含量の増加と低温耐性の低下の間に時間的なズレが生じている。また、材部において低温耐性は測定開始時の2月上旬より穏やかに失われつつあるが、水分含量はほぼ一定の傾向であった。クリにおいて枝水分および木部圧と芽の低温耐性の関係(堀本・荒木, 1999)が報告されており、枝の水分あるいは導管水の増加が凍害を誘発する要因であることが示唆されている。したがってニホンナシ「幸水」においても、同様に枝の水分増加が、芽における低温耐性との減少の要因となっ

ているとも考えられ、さらに落葉樹においては、落葉後の水分上昇はもっぱら根圧によるものと予想される (Sperryら, 1987) ので、根の吸水の開始時期を測定することが、低温耐性の減少時期や春季における低温耐性の強さを判定するための有効な指標になり得るかもしれない。

デハードニングにおいて花芽の水分含量が、低温耐性に大きく関わっていることが確認できたが、ハードニングにともなう水分含量の大きな変化はみられず、測定開始から低かった。Ishikawa・Sakai (1985) はチョウセンアザミの塊茎について低温耐性の変化を調査しているが、低温耐性の増大過程において水分含量はあまり変化しなかったことを報告している。そのため低温耐性の増大過程時とは異なり、ニホンナシ花芽の水分含量は低温耐性の獲得において主要な要因では無いことが考えられた。

## 2-3 ニホンナシ ‘幸水’ のハードニング・デハードニングにおける内生成分の物質変化

### 2-3-1 材料および方法

ニホンナシ ‘幸水’ の成木を用いて、花芽のアミノ酸含量、糖含量および内生ABA含量の秋から春にかけての変化について調査を行った。筑波大学農林技術センター栽植の20年生ニホンナシ ‘幸水’ 成木の花芽を使用した。発育枝を採取し、花芽を発育枝から切りとった。採取は1999年2月1日より同年4月13日まで、計7回行った。採取した花芽は液体窒素で凍結し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存し内生成分分析用の試料とした。同様に、2000年10月から2001年4月まで花芽を採取した。採取した花芽は外部鱗片 (OS)、内部鱗片 (IS)、小花 (FL)、包葉 (Br) の各部位ごとに分解し (第2図)、分析の試料とした。

### 内生遊離アミノ酸含量

抽出、精製ならびに分析は、Szalaiら (1997) の方法に従って行った。試料を乳鉢で粉砕し、得られた粉末に蒸留水を加えて攪拌した後、7,000rpm、 $4^{\circ}\text{C}$  で10分間遠心分離した。その後得られた上澄みに対し、同量のクロロホルムを加え

て脱脂し、2層分離後、水層を得た。5%TCA (trichloro acetic acid, トリクロロ酢酸) を同量混合し、3,000rpmで5分間遠心分離し、タンパク質を除去して上澄みを得た。2Nの水酸化ナトリウム溶液を加えることにより、pH2.2に調整し、 $0.45\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (DISMIC-25AS, ADVANTEC) で濾過して遊離アミノ酸の試料とした。定量はアミノ酸分析システム (CR-7A/LC-10As, Shimadzu) で行った。標準アミノ酸溶液はアミノ酸混合液 (和光純薬製H型) を0.2Nクエン酸三ナトリウム、pH2.20で希釈して使用した。カラムはNa型強陽イオンカラム (Shimpack Amino-Na, Shimadzu) を用い、カラムの温度 $60^{\circ}\text{C}$ 、流速 $0.6\text{ml/min}$ 、蛍光検出器、励起波長 $350\text{nm}$ 、検出波長 $450\text{nm}$ で行った。なお移動相はアミノ酸分析移動相キットNa型 (Shimadzu)、反応液はアミノ酸分析用反応液キットOPA (ortho-phthalaldehyde, オルトフタルアルデヒド) 試薬 (Shimadzu) を用いた。採取したサンプルはそれぞれグループに分けて、各グループについて1回ずつ分析を行い、3反復とした。

### 糖含量

試料を粉砕した後、80%エタノールで2回抽出した。得られた抽出液は $40^{\circ}\text{C}$  で減圧濃縮し、水相を得た。この水相をイオン交換樹脂 (Amberlite IR-120BおよびAmberlite IRA-400) を用いて精製した後、0.15M水酸化バリウムと0.15M硫酸亜鉛を加えて除タンパク質を行い、蒸留水を加えて希釈し、内部標準物質であるペンタエリスリトールを加え、バイアル瓶中で乾固した。その後デシケータ内で完全に脱水させた後、無水ピリジンに溶解し、HMDS (hexamethyl disilazane) とTMCS (trimethylchlorosilane) を加えて $160^{\circ}\text{C}$  で加熱し、トリメチルシリル (TMS) 化を行い、GLC (GC-9AM; Shimadzu) による分析に用いた。分析にはSE-52を充填したガラスカラム、温度条件は $160\sim 250^{\circ}\text{C}$  の $5^{\circ}\text{C/min}$  の昇温で行い、キャリアーガスはHe、水素炎イオン化検出器 (FID) を用い、測定した。また花芽における構成部位ごとの糖含量についてはHPLC (Toso Co., 8000シリーズ)

による分析を行った。試料を粉碎し、80%エタノールで2回抽出した後、抽出液は40℃で減圧濃縮し、水相を得た。この水相をイオン交換樹脂 (Amberlite IR-120BおよびAmberlite IRA-400) を用いて精製した後、蒸留水を加えて希釈し、0.45  $\mu$ mのメンブレンフィルター (DISMIC-25AS; ADVANTEC Co.) で濾過して糖分析の試料とした。HPLCの条件は、カラム (Shim-pack SCR-101C, SHIMADZU), 移動相: D.W., 流速 1.0ml/min, 検出器: 示差屈折 (RI) 検出器とし、測定を行った。採取したサンプルはそれぞれグループに分けて、各グループについて1回ずつ分析を行い、5反復とした。

### 内生ABA含量

抽出、精製ならびに分析は、Uthaibutra・Gemma (1991) の方法に従って行った。試料を粉碎した後、ポリビニルポリピロリドン (PVPP) を含む80%冷エタノールで2回抽出した。抽出液は減圧濃縮し、水層を得た後、16,000rpmで15分間遠心分離し、常法に従って酢酸エチル可溶性分画を得た。この分画を乾固させ、少量のメタノールを含む蒸留水で溶解した。溶解したものをSep-pak C18カートリッジ (Waters Co.) を用いて精製した後、少量のPVPPを加えてよく振り、3,000rpmで2分間遠心分離した。その後上澄みを0.45  $\mu$ mのメンブレンフィルタ (SLLH R04 NL; Millipore) で濾過し、HPLC (Toso Co., 8,000シリーズ) を用いて定量した。HPLCの条件は、カラム: ODS (Super ODS, Toso Co.), 移動相: メタノール/水 (40:60) +0.1%酢酸, 流速1.0ml/min, 検出器: UV吸収検出器 (254nm) とした。採取したサンプルはそれぞれ3グループに分けて、各グループについて1回ずつ分析を行い、3反復とした。

## 2-3-2 結果及び考察

### 内生遊離アミノ酸量

ニホンナシ '幸水' の發育枝から採取した花芽内のアミノ酸について測定を行い、11種が同定できた (第9図)。1999年4月3日に花芽は萌芽し、

その後4月16日に開花した。満開日は4月21日であった。冬から春にかけてのデハードニング過程の内生遊離アミノ酸含量の経時的变化を第10図に示した。個々の遊離アミノ酸についてみると、負電荷を有するアミノ酸の中で、アスパラギン酸、グルタミン酸ともに測定開始時の2月上旬より緩やかに上昇し、3月中旬においてわずかに減少するが、その後は上昇し続けた。正電荷を有するアミノ酸の中では、アルギニンが一度2月の中旬に

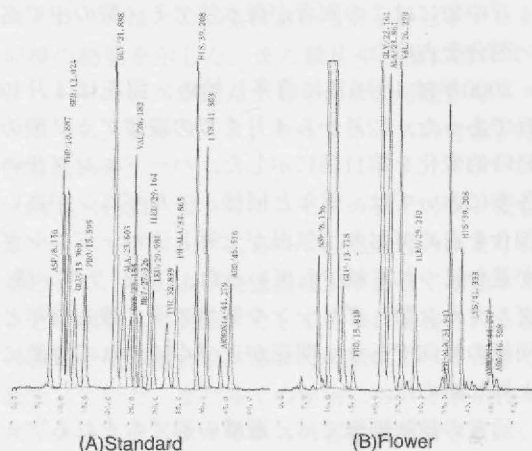


Fig. 9. Amino acid chromatograms with standard (A) and flower of Japanese pear flower 'Kousui'.

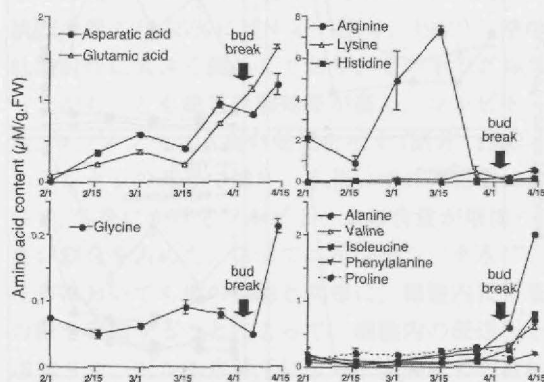


Fig. 10. Change in free amino acid contents of flower bud of 'Kousui' Japanese pear during dehardening in 1999. Vertical bars represent S.E. (n=3)

減少した後、急激に上昇し、3月15日にピークを迎えた後、急激に減少した。中性の極性アミノ酸では、グリシンは開花まで大きな変化は認められず低い値を保ち、その後急激に増加した。疎水性のアミノ酸の中では、芽の生長が活発になるまでは、プロリンが比較的高い割合を占めていた。そして花芽の発芽後、全アミノ酸に対する割合は低下したもののアラニン、イソロイシン、バリンやフェニルアラニンと共に含量は増加する傾向があった。なかでも、アラニンの増加が顕著であり、4月中旬にはこの両者が疎水性アミノ酸の中で高い割合を占めた。

2000年は4月6日に萌芽し始め、開花は4月19日であった。12月から4月までの遊離アミノ酸の経時変化を第11図に示した。ハードニング後の冬季においては、前年と同様、アルギニンが高い割合を占めており、気温が上昇しデハードニングが進むにつれて減少していった。アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシンや他のアミノ酸も前年と同様の傾向であり、開花が近づくにつれて急激に上昇し始めた。

通常の植物細胞では、遊離の形で含まれるアミ

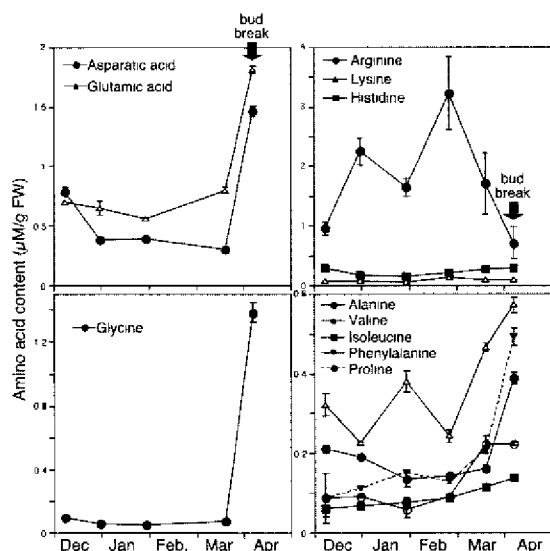


Fig 11. Change in free amino acids contents of flower bud of 'Kousui' Japanese pear during hardening and dehardening in 2000-2001. Vertical bars represent S.E. (n=5)

ノ酸はわずかな量であり、高い濃度で蓄積することはあまりない(坂野, 1981)。このことは細胞内でアミノ酸合成がフィードバック調節により厳しく調節されており、必要とする適正量だけ合成し、必要以上の代謝中間体を蓄積しないようにしていることを示している。帯刀(1996)はニホンナシ '幸水' の冬季における全アミノ酸含量は自発休眠覚醒期に急激に上昇し、その後減少すると報告している。今回の実験でも、ハードニング後の厳冬期においては低い値であったが、気温の上昇につれてその量を増加させ、特に花が開花する直前には急激な増加を示した。これは花芽の萌芽、開花と続く、一連の急激な発育活性に際し、タンパク質の合成などに必要とされるアミノ酸量の需要が高まったため、活動の少ない冬季に比べ全アミノ酸量が多くなったものと考えられる。

また高等植物の越冬中の代謝産物としては、Sagisaka (1974) によって特異的なアミノ酸の蓄積が報告されており、生長期にある植物ではグルタミン酸の量が非常に多いが、冬季にはアルギニンが増加するとされている。本研究で使用した '幸水' の花芽においても、ハードニング後はアルギニンがグルタミン酸に比べ多く含まれており、同様の結果が得られた。また、アルギニンはデハードニング中急激に減少し、一方グルタミン酸やアスパラギン酸の量が急増しており、花芽においてアルギニン合成からグルタミン酸合成へと転換が起きていると考えられ、デハードニング過程では遊離アミノ酸量の特異的な変化があることが分かった。植物の中には越冬中のアミノ酸として、アルギニンの他にプロリンを蓄積するものも知られている(酒井, 1982)。しかし今回の測定ではニホンナシ '幸水' の花芽中にはハードニング過程においては、ごくわずかしかな存在してなく、デハードニング過程においても、他のアミノ酸同様、開花直前に急激に上昇し、低温耐性を与える働きは少ないものと考えられた。

## 糖含量

第12図にデハードニング中のニホンナシ '幸水' 花芽における糖含量の経時変化を示した。2月

の初めからいずれの糖も減少を続け、開花直前の4月上旬まで減少していった。花芽における糖はソルビトールが多く、低温耐性が高い2月中旬には全糖含量の65%を占めた。

花芽中の各部位における糖含量の経時的変化を第13図に示した。部位ごとにみると、花芽全体で測定したときと同様、ソルビトールが主要な糖であった。小花においてハードニングするにつれて

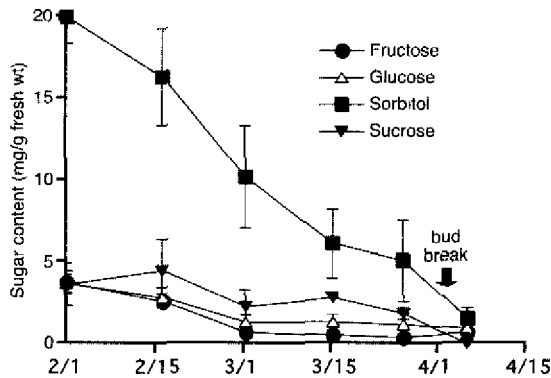


Fig. 12. Change in sugar contents of flower bud of 'Kousui' Japanese pear during dehardening in 1999. Vertical bars represent S.E. (n=5)

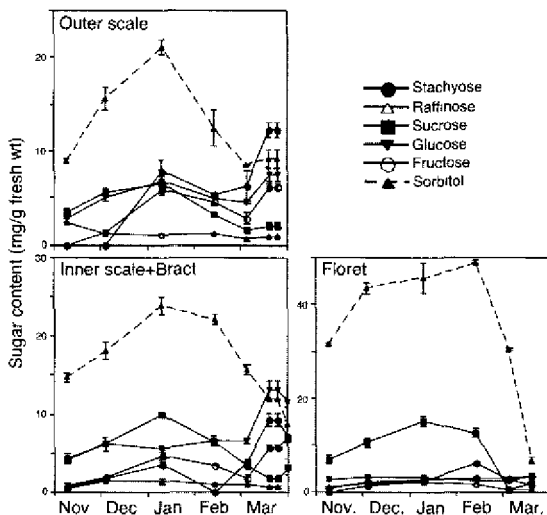


Fig. 13. Change in sugar contents in different parts of flower bud of 'Kousui' Japanese pear during hardening and dehardening in 2001-2002. Vertical bars represent S.E. (n=5)

ソルビトール、スクロース含量が増加し、またその後のデハードニング過程においては急激に減少した。外部鱗片と内部鱗片+包葉においては、ハードニング過程においてソルビトールおよび他の糖含量が増加し、デハードニング過程においては減少し、ほぼ同様の傾向であった。しかし小花に比べると、その増加する時期は遅れており、また反対にピークを迎えた後は小花よりも先に減少を開始した。糖の量は小花が最も多く、鱗片に比べソルビトール、スクロースともに約2倍であった。スクロースはどの部位においてもソルビトールと同様の動態を示した。また鱗片や包葉において、デハードニングが進んだ萌芽直前の時期からスタキオース、グルコース、フルクトースの含量が増加し始めた。

酒井(1982)はクワヤニセアカシアのジン皮組織で、ハードニングにおいて低温耐性の高まりに対応して、糖および浸透濃度が平衡して増加することを報告している。そして冬季に蓄積される糖の種類やその割合は、植物の種類によって大きく異なっていた。また多くの植物において冬季にラフィノースやスタキオースの蓄積が報告されている(酒井, 1982)。ニホンナシの花芽においては、ラフィノースはごく少なかったが、外部鱗片においてスタキオースの蓄積が認められた。バラ科植物のバラ、リンゴなどにおいては、ソルビトールなどの糖アルコールが夏から冬にかけて増加し、糖の全量の40-55%に達する(酒井, 1982)。糖は低温耐性に大きく関与しており、その中でグルコースがもっとも凍害防御効果が高く、ソルビトール、ラフィノースも高い効果を示す(酒井, 1982)。ニホンナシの花芽で鱗片、小花いずれの組織において、冬季にかけてソルビトールの含量が増加し、高い割合を占めた。よってニホンナシ「幸水」の花芽においても他の植物と同様に、細胞内に多量の糖を蓄積することによって、細胞内の浸透圧を増加させ、モル氷点降下により一定温度での凍結脱水の程度を緩和させている(吉田, 1999)と考えられた。

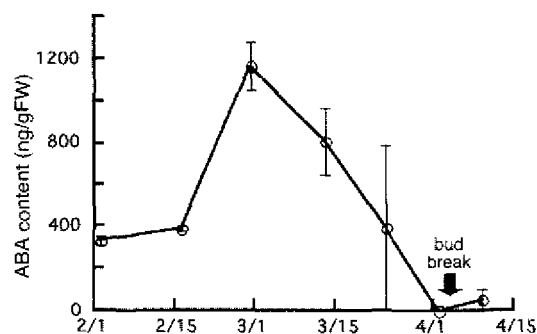


Fig. 14 Change in abscisic acid contents in flower bud of 'Kousui' Japanese pear in 1999. Vertical bars represent S.E. (n=3)

### 内生ABA含量

ニホンナシ '幸水' の発育枝から採取した、花芽における内生ABA含量の経時的変化を第14図に示した。内生のABA含量は1999年2月の中旬より上昇し、3月の初旬にピークがみられ、その後減少した。そして4月上旬の開花とともにわずかに増加した。ABA含量のピークを迎えた3月上旬の低温耐性は、厳冬期である2月に比べ著しく高いわけではなく、むしろ急激に低温耐性が弱まる直前であり、ABAの含量と低温耐性の間に相関が認められなかった。

花芽中の小花における内生ABA含量の経時の変化を第15図に示した。ハードニングが完了する12月まで、内生のABA含量は上昇し、その後急激に減少し、3月中旬にデハードニングが始まるに伴って、再び急激に上昇した。このように花芽におけるABA濃度とデハードニングとの間には直接的な関係がみられなかった。

田村ら(1993)は自発休眠中におけるニホンナシ '二十世紀' の芽中のABA含量が低温遭遇とともに低下し、またABA含量の低下する時期が遭遇する低温の強さによって異なることを報告している。またABAは植物の乾燥時における気

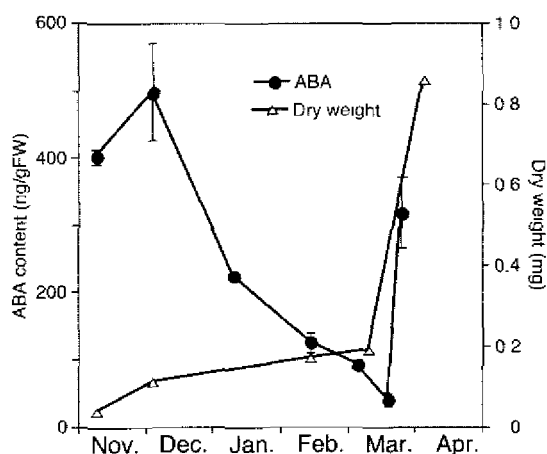


Fig. 15. Change in abscisic acid contents and dry weight of florets in 'Kousui' Japanese pear in 2001-2002. Vertical bars represent S.E. (n=3)

孔の閉鎖において重要な役割を果たし(近藤, 1994), また根あるいは頂芽にABAを処理したヒマワリにおいて、根から茎への水の移動が促進(Ludewigら, 1988)されている。このようにABAは植物の水分状態と密接に関与していると思われる。花芽全体で見たときABAのピークを迎えている時期は、花芽の水分含量が増加する直前である。このころから花芽の鱗片基部周囲の木化していない組織が成長を始め、また小花の大きさが大きくなり、花芽全体がふくらみ始める。したがって花芽におけるABAの含量が増加することにより、花芽の肥大に伴い根から花芽への水の移動が促進された可能性が考えられる。

以上のようにハードニングに伴い、小花の内生のABA含量が増加したことから花芽の低温耐性獲得にABAが直接的に関与し、デハードニング中のABAは、植物体内の水分輸送に関与することにより、低温耐性に間接的に関係しているのではないかと示唆された。

### 第3章 ニホンナシ‘幸水’の花器および幼果の低温耐性

#### 3-1 緒言

ニホンナシを含む果樹は、花蕾期や開花期、そして幼果期において低温に対して感受性が強く、特に被害を受けやすい(小林, 1985)。したがって降霜時における傷害発生の有無は、果樹の生長周期と深い関係があるといえる。開花期前後の低温は、雌ずいや胚珠を枯死に至らしめ、ひいては花そう全体が枯死する(猪俣ら, 1993; 猪崎, 1985)。また被害が著しいと、幼果において表皮に亀裂や染みやできてしまう(猪崎, 1985)。またニホンナシの花器の構成器官や、花の生長ステージによって霜に対する感受性が異なっていると考えられている(小沢・本田, 1995)。

前章においてハードニングにおいて獲得した低温耐性は、気温の増大とともに速やかに失われることが確認できた。また、デハードニングが進むにつれて低下する花芽中の溶質、特に糖の含量がその要因である可能性が示された。

受粉・受精が行われる開花期やその後の果実肥大初期は、果実生産にとり非常に重要な時期であり、複雑な構造を持つ花器と、それを構成するそれぞれの花器官における低温耐性の機構は、数々の報告があるが未だに十分な情報が得られていないのが現状である。そこで、この章ではニホンナシの開花期の花器について、低温による傷害の機構を明らかにすることを目的とした。

#### 3-2 材料および方法

供試植物は、筑波大学農林技術センター内で栽培されているニホンナシ品種‘幸水’の花器と幼果を用いた。1999年4月18日(花蕾期)、4月21日(満開期)、4月30日(幼果期)の3回にわたって、花器または幼果を採取し、実験材料とした。凍結試験は採取した花器や幼果をアルミホイルで包み、アルコールバスに設置した広口の試験管の中に入れた。その後5℃、0℃でそれぞれ30分ずつ予冷した後、5℃/hの冷却速度で-5℃まで冷

却した。-5℃で1時間保持したものをそれぞれ水中で1時間、ゆっくりと融解し、その後5℃で1週間おいた後の電解質漏出量と傷害(褐変)の程度を測定し、低温耐性を評価した。電解質漏出率の測定は、前章に示したものに準じて同様に行った。褐変の程度は0から3までの4段階(0-褐変部無し、1-胚珠、雌ずいが褐変、2-花托、花柄まで褐変、3-全体が褐変)で評価した。測定は花そうから3~4番花を選び、6花ずつ評価した。

また、2000年4月19日(開花初期)には、2本の成木から結果枝ごと花器を採取し、凍結試験を行った。採取した結果枝は3花そうずつになるよう分断し、乾燥を防ぐため切り口にシリコンオイルを塗布し、氷とともにポリエチレンの袋に入れた。その後アルコールバスに設置した広口の試験管の中に入れた。5℃、0℃でそれぞれ30分ずつ予冷し、2℃/hの冷却速度で-3、-5、-7℃まで冷却した。設定温度に達した時点で取り出し、前述と同様の処理をした後、花器を花弁、雄ずい、雌ずい、花托(がく片、胚珠を含む)、花柄に分解し(第16図)、電解質漏出率と褐変の程度を測定し、低温耐性の評価とした。採取した花そうはそれぞれ3グループに分けて、花そうから3~4番花を選び、電解質漏出率は各グループについて6花、褐変の程度は20花ずつ測定を行い、それを3反復行った。

さらに花弁、雄ずい、雌ずい、がく片、花托(胚

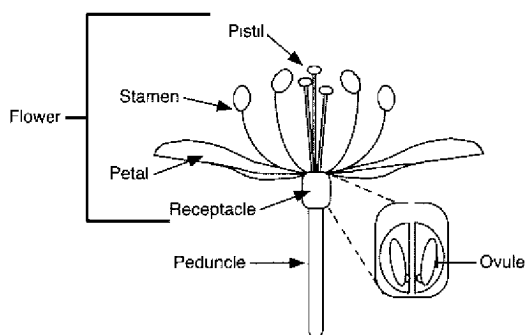


Fig. 16. Diagram of flower component organs: petal, stamen, pistil, receptacle, ovule and peduncle of 'Kousui' Japanese pear

珠を含む), 花柄の糖含量を測定した. 方法は前章に示した方法と同様である. 採取した花器はそれぞれ3グループに分けて, 各グループについて8サンプルずつ測定を行い, それを3反復行った.

### 3-3 結果および考察

凍結試験後の花器および幼果の様子を第17図に示した. まず花托の表皮の下に空洞ができる浮き皮と呼ばれる現象がおこり, 胚珠や雌ずいに傷害がみられ, 温度が低下するにつれて他の部分においても傷害が観察できた. しかし, なかには花器では傷害が見られず, 花柄の途中で折れるように傷害を受けたものも散見された. 以上のように, 花托・子房部で低温障害の特徴である組織の褐変が, 花柄・果梗部よりも先に発生しているのが確認できた. 褐変の程度の強さと電解質漏出率を第18図に示した. 花蕾期から満開期にかけて花のステージが進むにつれて, 低温 ( $-5^{\circ}\text{C}$ ) による被害の程度が大きくなった. 褐変の程度と電解質漏出率との間には, ほぼ同様の傾向がみられ, 強い正の相関が見られた ( $R=0.92^{***}$ ) (第19図). 1999

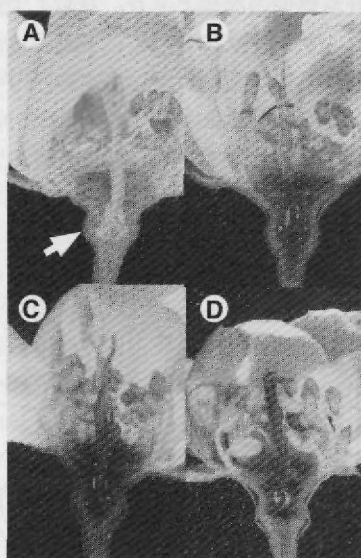


Fig. 17. Occurrence of freezing injury on Japanese pear flower 'Kousui' after freezing test. A=slight, D= severe injured. Arrow shows a cavity under the epidermis in receptacle.

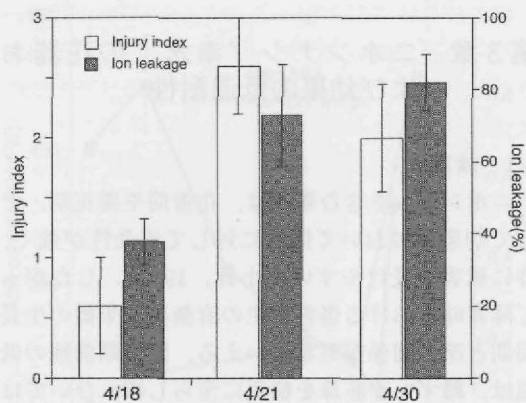


Fig. 18. Time-course changes in injury index and ion leakage (%) of florets of 'Kousui' Japanese pear exposed to  $-5^{\circ}\text{C}$  for 1 h in 1999. Freezing injury was rated on a scale of 0 to 3 where 0=no injury, 1=ovule and pistil were damaged, 2=damage spread to receptacle and/or peduncle, 3=flower damaged completely. Vertical bars represent S.E. ( $n=6$ )

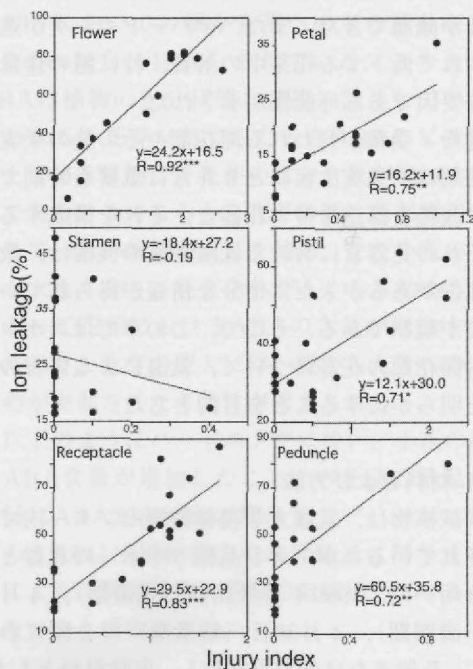


Fig. 19. Statistical regressions of linear equations of injury index and ion leakage (%) in flower and flower components after freezing of 'Kousui' Japanese pear. \*, \*\*, \*\*\*. Significant at  $P<0.05$ , 0.01, 0.001 by Spearman's rank correlation.



年の実験では、花器および幼果全体の電解質漏出率から低温耐性を評価したため、花器および幼果内の花柱や葯、胚珠、子房、花柄などの器官間の低温耐性の差や、花器の中での傷害を受ける温度を知ることはできなかった。そのため2000年には花器の構成器官ごとの低温耐性の評価を詳細に行った。電解質漏出率は、まず花托および花柄において増大する傾向が確認でき、その後雌ずいにおいても $-5^{\circ}\text{C}$ から増大した(第20図)。花の各構成器官においても、電解質漏出率と褐変の程度から判定した被害度の間には、花托( $r=0.83^{***}$ )、花弁( $r=0.75^{**}$ )、花柄( $r=0.72^{**}$ )、雌ずい( $r=0.71^{*}$ )で強い正の相関があったが、雄ずい( $r=-0.19$ )では相関関係は認められなかった(第19図)。

低温耐性にはクロロフィル蛍光( $F_v/F_m$ )や生体染色法、トリフェニル・テトラゾリウムクロライド(triphenyltetrazolium chloride)還元法も応用され、電解質漏出率による判定法よりも傷害の被害度を正しく示すとする説もある(Boorse

ら, 1998)。しかし、今回の試験においてニホンナシ‘幸水’花の電解質漏出率と褐変の程度から判定した被害度の間には、強い正の相関が見られた( $R=0.92^{***}$ )ため、本法による判定も、ニホンナシ‘幸水’花では十分適用できると判定した。

花器の各構成器官の回帰直線がそれぞれ異なるので、ニホンナシ‘幸水’花の構成器官の間に低温耐性の違いがあることが考えられ、電解質漏出率の値の大小だけでは、異なる器官間の被害の程度を判定することはできないと考えられた。よって、電解質漏出率のよる判定法は、同じ器官同士における低温耐性の判定でのみ有効であろう。

褐変の程度で低温耐性を判定した場合、零度に近い比較的高い低温( $-3^{\circ}\text{C}$ )では花托、胚珠、雌ずいで傷害の程度が大きかったが、より低温では胚珠、雌ずいの傷害が花托に比べ、大きかった(第21図)。花柄は花托に比べ、より低い温度で傷害が現れた。以上の結果からニホンナシ‘幸水’花器のなかでも胚珠や雌ずいが低温耐性が低く、花柄、雄ずいは比較的高いことが分かった。花托

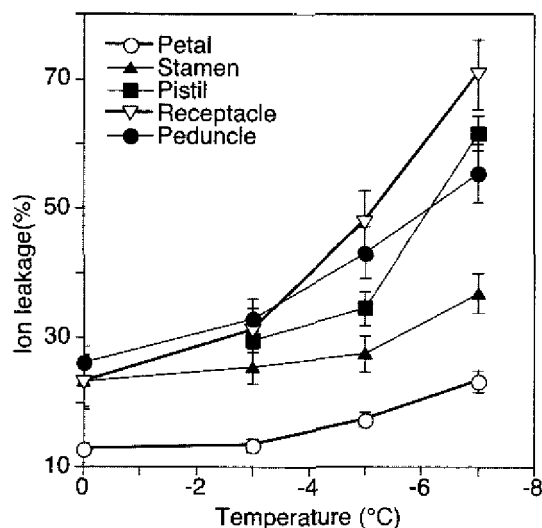


Fig. 20. Comparison of cold tolerance among flower components in; petal, stamen, pistil, receptacle (including sepal and ovule), and peduncle of 'Kousui' Japanese pear flower as expressed by ion leakage in 2000. Vertical bars represent S.E. ( $n=18$ )

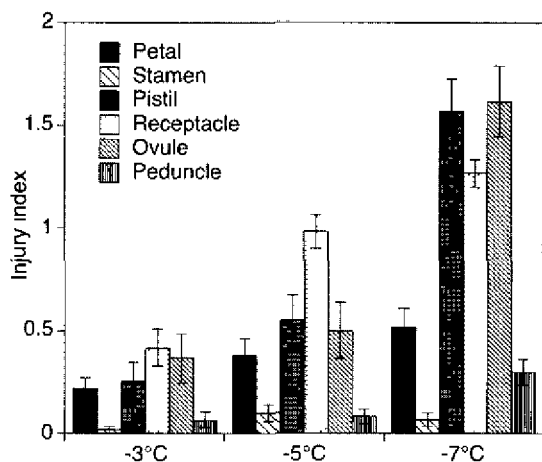


Fig. 21. Comparison of cold tolerance among flower components in; petal, stamen, pistil, receptacle, and peduncle of 'Kousui' Japanese pear flower at the balloon stage in 2000. Low temperature injury was rated on a scale of 0 to 3 where 0=no injury, 1=water soaked and slight browning, 2=moderate browning, 3=the organ was completely damaged. Vertical bars represent S.E. ( $n=60$ )

は傷害の現象が現れるのは早いものの、その程度は軽微であり、致命的な傷害は受けにくかった。

### 糖含量

花器の構成器官別にみると、低温試験によって傷害を受けやすかった雌蕊、花托（胚珠を含む）において、ソルビトール、グルコース含量が他の部位に比べ低く、全糖含量も低い値であった（第22図）。糖質中、グルコースがもっとも凍害防御効果が高く、ソルビトール、ラフィノースも高い効果を示す（酒井，1982）ので、今回の実験の結果は低温耐性の部位間の差異を解釈する上で有用な試料である。一方、ソルビトールはプロリン同様、細胞内で浸透圧を調節する働きのある適合溶質（中村・高倍，1999）、すなわち植物が浸透圧ストレスに応答して、細胞内に蓄積する低分子有機化合物で、塩のように細胞内の酵素活性を阻害しないとされている。適合溶質の集積は細胞液の凍結温度を低下させるので、ニホンナシの花器においてソルビトールおよび全糖含量が多い部位では、過冷却により凍結が回避された可能性が示唆された。また凍結やそれに伴う脱水時にも原形質

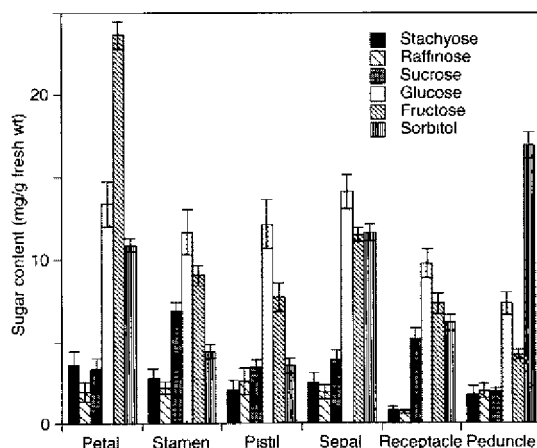


Fig. 22. Comparison of sugar contents among flower components in; petal, stamen, pistil, receptacle, and peduncle of 'Kousui' Japanese pear flower in 2001. Vertical bars represent S.E. (n=24)

膜やタンパク質がそれらの溶質により保護された（Sakai・Yoshida, 1968；吉田，1999）かもしれない。

## 第4章 ニホンナシ‘幸水’花芽、花器の凍結様式

### 4-1 緒言

植物体の多くの部分は水で構成されており、平均すると、原形質は85～90%、葉緑体やミトコンドリアなどでは50%の水を含んでいる。含水量が特に多いのは果実（85～95%）や、根（70～95%）であり、反対に熟した種子では10～15%の水分しか含まないものもある。このように水は生体構成成分の大部分をしめ、生体の構造を保ち、機能を維持する上で重要な役割を果たしている。植物が氷点下で生存する際には、氷晶の形成は避けることができない現象であると同時に、凍結傷害の前提条件として、また低温耐性の機構解明においても重要なポイントである（Rodrigo, 2000）。凍結障害の要因として、致死的な細胞内凍結の他に、細胞外凍結時の氷晶形成（ice nucleation）による水分ストレスが挙げられる。氷晶の形成と水分含量は関係が深く、一般に水分含量が低く、細胞液の浸透圧が高いと低温耐性が強いことが報告されている（酒井, 1982）。さらに、細胞中の溶質の変化が、低温耐性に影響を与えられている（Sasakiら, 1998；吉田, 1999）。そのため、細胞、組織、器官レベルにおける過冷却や氷晶の形成などを含む凍結様式を明らかにし、制御することができれば、植物における低温耐性機構解明に大きく寄与できると思われる。

落葉果樹の花器における霜害は低温そのものよりも、氷晶の形成が要因であると考えられており（Rodrigo, 2000）、霜害の防止は氷晶形成の制御が重要である（Wisniewskiら, 1997）。

赤外線サーモグラフィは、植物組織が凍結する時の潜熱の解放を二次元の画像として視覚的に確認できるため、植物における氷晶の形成やその伝搬を調査するうえで有用であり、モモ、リンゴ、セイヨウナシやクランベリー、クロフサスグリにおいて凍結過程の観察に使用されている（Ceccardiら, 1995；Wisniewskiら, 1997；Fuller・Wisniewski, 1998；Workmasterら,

1999）。しかし、ニホンナシの花器においての報告は無いため、今回赤外線サーモグラフィによる花器の凍結過程の観察を行った。

液相の水が氷晶に成長する際には鑄型が必要であり、氷核活性物質とはその鑄型として働く物質であると考えられている（荒田, 1998）。氷核活性を持つ物質に関する研究の歴史は長く、初めにヨウ化銀が氷核活性を持つことが報告（Vonnegut, 1947）され、人工降雨のための氷核として用いられているが、霜害に氷核活性細菌が関わっていることが明らかになったのは、比較的最近のことである（Schnell・Vali, 1972）。その後 *Pseudomonas syringae* が氷核細菌であることが確認（Makiら, 1974）され、氷核細菌が霜害に大きく関わっていることが明らかにされてきた（Ashworth, 1992；荒田, 1998）。植物において氷晶を形成する要因の一つは氷核活性細菌であるが、一方、最近になってモモの枝（Ashworth, 1985a；Grossら, 1988）、ツツジの鱗片（Ishikawaら, 1992；Ishikawaら, 2000）、冬コムギの葉（Brushら, 1994）の細胞壁や細胞内に氷核形成物質があることが報告された。しかし、植物組織における氷核活性（INA, ice nucleation activity）には、未解明の部分が多く、本章では植物における氷晶の形成を制御していると考えられる氷核活性（氷晶の形成しやすさ）について調査した。

以上のように、本章はニホンナシ‘幸水’花器における傷害機構に関して、赤外線サーモグラフィによる観察や花器における氷核活性の測定を行い、その凍結様式（freezing pattern）を明らかにすることを目的とした。

### 4-2 赤外線サーモグラフィによるニホンナシ‘幸水’花器の凍結過程の観察

#### 4-2-1 材料および方法

筑波大学農林技術センターにおいて育成した、ニホンナシ‘幸水’の2年生苗を1998年10月20日に畑土とソイルミックス（サカタのタネ）の混合土（6：4）を培土とした直径25cmのポットに鉢上げし、自然日長下で生育させた。灌水は慣行に

従い、培土表面の乾燥状態で判断し、2 mm程度灌水した。実験に供した2001および2002年の展葉期から幼果期にかけて、ポット植樹は120cm程度に切り戻し、樹高を調節した。ポット植樹はまず2℃で30分間低温順化させた後、-6℃に設定した低温庫に移した。冷却ファンからの風は、発泡スチロールの板でポット植樹に直接当たらないようにした。

花芽および幼果における凍結時の温度変化過程は、赤外線サーモグラフィビデオカメラ (model TVS-2000MK, NIPPON AVIONICS) を使用して観察し、熱画像はフロッピーディスクに記録した。記録した熱画像は赤外線熱画像分析ソフトウ

ェア (PicEd Avio, NIPPON AVIONICS) により解析を行った。発熱現象を表示するために、温度範囲は紫 (-5℃) から白 (-2℃) で表示した。選択した温度範囲よりも下の温度は黒で、上の温度は白で表示した。37本のポット植樹を観察し、その中から最も明瞭な画像を選んだ。また、記録したサーモグラフィから花器の各部位の凍結曲線を作成し、過冷却点 (過冷却が破れる温度) を凍結 (開始) 温度とした。

#### 4-2-2 結果及び考察

ポット植樹を-6℃の低温に曝露させた場合、花器組織の温度は10分以内に急激に-6~-4℃に

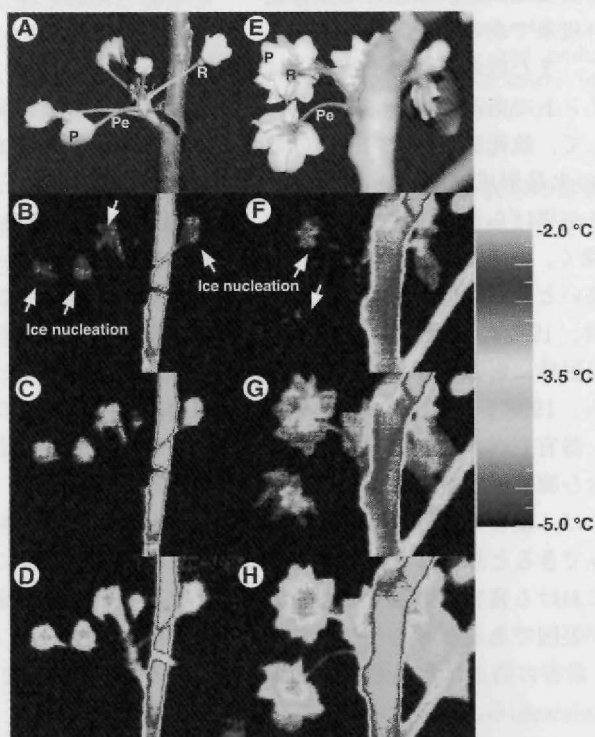


Fig. 23. Ice nucleation and propagation in potted Japanese pear 'Kousui' tree at balloon and flowering stage as seen with IR video thermography during freezing test. Colors of the temperature range from violet (colder, -5℃) to white (warmer, -2℃). With balloon flowers (A, B, C, D), the IR images in each of B through D are shown in time order. Ice nucleation initially occurred in petals (P), sepals and/or receptacle (R) after the temperature of their tissues decreased at about -5~-6℃ (B, arrow) and then propagated out along the peduncle (Pe) within 100s after ice nucleation (C, D). With opening flowers (E, F, G, H), the IR images in each of F through H are shown in time order. The sepals and/or receptacle (R) were initially frozen as indicated by the bright region (F, arrow), and then the ice nucleation propagated to the petals (P) and along the peduncle (Pe) within about 90s after the freezing event began (G, H).

下がった。さらに凍結時の温度変化（発熱現象）は、平均1～3℃の温度の上昇が明らかな色の変化として観察できた（第23図）。花蕾期の花器においては花托よりも花柄においてより速く温度が下がり、その後、約-6～-5℃まで過冷却した。最初の凍結は、花弁、がく片および花托周辺で起こることが観察できた（第23図、A～D）。その後、最初の凍結による発熱が確認されてから、100秒以内には凍結は花柄に伝搬していった。花蕾期における花の各組織の平均凍結温度は、花弁では $-5.6 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  ( $n=12$ )、花托が $-5.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  ( $n=8$ )、花柄が $-5.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  ( $n=8$ ) であった（第1表）。

開花直後の花器においても、花托に比べ花柄で先行して温度が下がって行き、約0.5～2℃低かった。その後、 $-6 \pm 1^{\circ}\text{C}$ まで過冷却した。まずがく片・花托の部分が、第23図E～Hで明るい色で示されているように凍結し始め、その後90秒以内にその凍結は花弁や花柄に伝搬していった。開花期の花における平均の凍結温度は、花弁では $-5.3 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  ( $n=20$ )、花托が $-5.2 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  ( $n=70$ )、花柄が $-6.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  ( $n=40$ ) であった（第1表）。凍結試験後、花そうは著しく傷害を受け、個々の小花において水浸状や褐変した組織が観察された。

幼果においては果実よりも花柄の先行的な温度低下が著しかった。花蕾期および開花期の花器とは異なり、 $-6^{\circ}\text{C}$ に約1時間曝露させたが、凍結による温度の上昇は確認できなかった。しかし凍結試験後、果実の表面にまだらの染みの傷害の様子が確認できた（第24図）。

以上のようにニホンナシ花器の凍結過程の観察には、赤外線サーモグラフィが有効であることが示された。今回の実験において花蕾期、開花期の花器において凍結はがく片・花托周辺から始まっており、その後、花器全体に拡がっていくことが確認された。前章の凍結試験で示されたように花器において傷害を受けた組織は、最初花托で確認され、その後、より低温に曝露するにつれて胚珠、雌ざいや花弁、花柄に拡がっていった。したがって、凍結試験後の傷害の現れる様子と赤外線サーモグラフィから得られた熱画像の変遷から、氷晶

Table 1. The mean ice nucleation temperature of each organ during freezing test in potted Japanese pear tree.

Stage/Organs	Temperature when freezing began $^{\circ}\text{C}$	n
Balloon		
Petal	$-5.6 \pm 0.3$	12
Receptacle	$-5.2 \pm 0.4$	8
Peduncle	$-5.8 \pm 0.2$	8
Open flower		
Petal	$-5.2 \pm 0.3$	20
Receptacle	$-5.2 \pm 0.1$	70
Peduncle	$-6.0 \pm 0.2$	40

Values are means  $\pm$  SE.

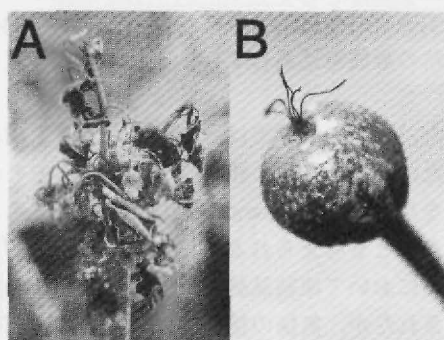


Fig. 24. Freezing injury of Japanese pear 'Kousui' 2 days, after the freezing test. The damaged tissues spread from flower to peduncle (A). The visible spotty stain appeared on the skin of young fruit (B).

はまず、がく片・花托の表皮上、またはその直下に形成され、その後、胚珠を経由して雌ざいや花柄に伝搬していくことが明らかになった。

幼果期の凍結試験では、赤外線カメラにおいて色の変化としての発熱の現象は検出できなかったが、果皮の表面に傷害の様子が観察できた。金田ら（2001）は甘果オウトウの過冷却した花芽が、凍結すること無く雌ざいが傷害を受けることを報告している。ニホンナシの幼果においても、同様な現象が花・果実において起こりえるのかもしれない。

花器の異なる組織において、過冷却できる限界点はその表面積や体積にも左右され異なっていると予想される。しかし、モモにおける氷晶形成と

その伝搬についての報告によれば、花器において形成された氷晶は直ちに枝を伝わり、最初の単一の凍結現象が開花しているモモの結果枝全体の凍結の引き金になる (Wisniewskiら, 1997) ことが示されており、氷晶が形成された組織が必ずしも過冷却する能力が低いとは限らない。しかし、今回の実験においては、枝を経由しての花の基部からの氷晶の伝搬は確認できなかった。これはニホンナシの花はモモとは異なり、かさ状の総状花序であり、氷晶の移動は花序の違いにより異なることが考えられた。Carterら (2001) は、クロフサスグリの小花柄における凍結の発熱はともわずかであり、解放された熱はすぐに霧散すると報告している。今回の実験においても、最初の小さな氷結の形成を見逃してしまったことも考えられる。

また、今回の実験では鉢植えしたポット植樹を用いたため、開花期の花が着生しているモモの切り枝を用いたWisniewskiら (1997) の結果と異なったことも考えられる。*Rhus laurina*の切り取った葉において凍結試験中、明瞭で急激な発熱が確認されたが、無傷の植物体の葉や茎では明確な発熱はみられない (Boorseら, 1998) ことから、ポット植樹は切り枝に比べ、氷晶の侵入が難しいと考えられる。ニホンナシ '幸水' においても、花そう間および花そうの中で傷害を受けた花と受けない花が混在したことから、モモの花芽 (Quammeら, 1995) やクロフサスグリ花器 (Carter, 1999) の凍結や傷害のパターンに関係するとされている、氷晶の伝搬を防ぐ障壁がニホンナシでも存在する可能性が示された。クロフサスグリでは、凍結した花柄と隣接している小花柄が、過冷却し続けた現象も確認されている (Carterら, 2001)。

もう一つの要因は速い冷却速度である。今回の実験において予冷した樹体を $-6^{\circ}\text{C}$ の低温庫に移動させたが、約10分間で $-6^{\circ}\text{C}$ ～ $-4^{\circ}\text{C}$ まで低下し、Wisniewskiら (1997) の実験に比べ、速い冷却速度であった。Kakuら (1980) はツツジの冬芽における小花を用いた凍結試験において、冷却速度が遅いときよりも早いほうが、凍結時の発熱は

$0^{\circ}\text{C}$  近くの高い温度でおこると報告している。Ashworth (1992) も速すぎる冷却速度は、過冷却の大きさを過大評価する恐れがあると指摘している。反対に氷晶の形成は温度そのものに相関があると仮定されるので、冷却速度はそれほど重要でないという意見もある (Lindowら, 1982; Hiranoら, 1985)。加えて低温環境下で赤外線サーモグラフィによって計測された表面温度は、熱電対での測定温度よりも低い温度を示すとの報告もある (宮下・米谷, 1999)。

ニホンナシ '幸水' の花器において、雌ずいや子房は霜害に対してもっとも被害を受けやすい部位である (猪俣ら, 1993; 猪崎, 1985) が、今回の実験から最初に氷晶が形成する部位はがく片・花托であり、またニホンナシの開花期のステージが進むにつれて、霜害に対する抵抗性は無くなっていく (小沢・本田, 1955) が、花器の異なる器官の凍結開始温度は、ステージが違ってそれほど変わらなかった。このように氷晶の形成しやすさと最終的な被害の大きさとの間に特に相関は見られなかった。このことはニホンナシ '幸水' の花器においては、それぞれの組織の水核活性と低温耐性の間に明確な関係がないことを示唆するものである。

今回の実験から、花托周辺で氷晶が形成されることが推定されたが、ニホンナシ '幸水' の霜害にあった花は、花托の表皮の下に空隙を持つことが多かった。クランベリーでは葉の表皮表面で形成された氷晶が気孔を通して体内に侵入し、果実表面では、ていあ部の蜜腺の跡から侵入して、葉や果実の凍結が始まる (Workmasterら, 1999)。ニホンナシでは氷晶形成が表皮の上なのか、その下なのかは判断できなかったが、第2章で示したように、低温試験により褐変した組織は初め胚珠にあらわれ、その後雌ずいに拡がっていくこともあわせると、氷晶は花托周辺でまず形成され、胚珠を介して雌ずいまで伝搬していく可能性が考えられた。

### 4-3 ニホンナシ‘幸水’のハードニング・デハードニングにおける氷核活性の変化

#### 4-3-1 材料および方法

氷核活性の測定は、Ishikawaら（2000）の方法に従って行った（第25図）。供試植物としては、筑波大学農林技術センター内で栽培されている花蕾期から幼果期のニホンナシ品種‘幸水’の新梢および花芽を使用した。新梢（一年生枝）は節の部分を除き、0.5cm長に切り、花芽は外部鱗片（OS）、内部鱗片（IS）、小花（FL）、包葉（BR）の各部位ごとに分解し（第2図）、試料とした。それぞれオートクレーブをかけた滅菌水2mlとともに試験管に入れ、40%ポリエチレングリコールを満たした凍結試験用のバスに設置した。各部

位ごとに20個体ずつ測定した。0.3℃で温度平衡させた後、1.0℃ずつ段階的に温度を下げていった。温度を下げ始めてから25分間、設定した温度で平衡させ、その後、水が凍結している試験管の数を数えた。50%の試験管が凍結した温度を氷核活性とした（第25図）。凍結したサンプルはオートクレーブ（121℃、20分）で加熱した後、クリーンベンチ内で滅菌水を取り替え、再び氷核活性を測定した。また花器の各器官の乾物重も測定した。

#### 4-3-2 結果及び考察

1999年の秋における外部鱗片、内部鱗片および新梢における氷核活性は、小花および包葉に比べ

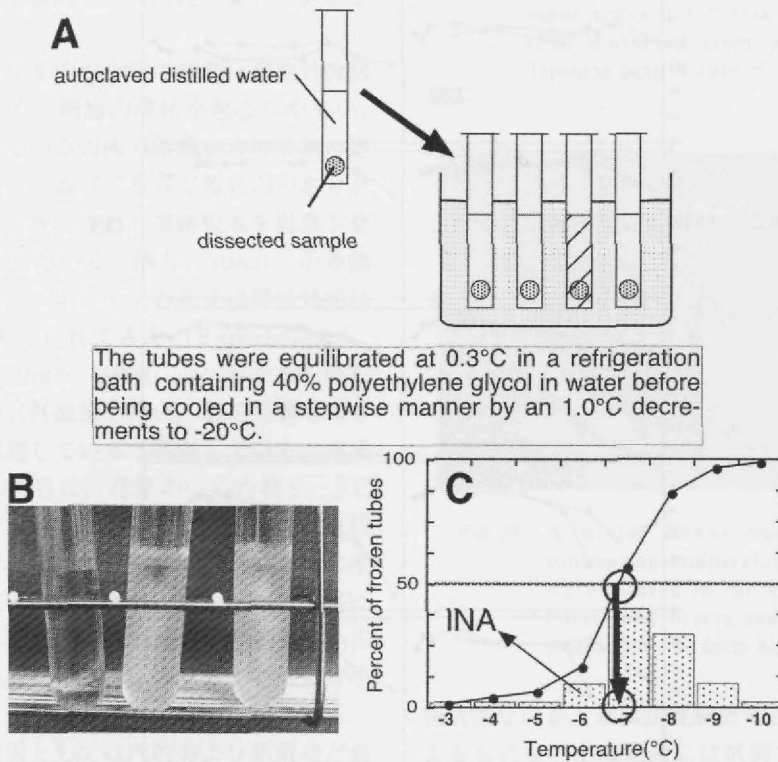


Fig. 25. Ice nucleation assay. The tubes were equilibrated at 0.3℃ in a refrigeration bath containing 40% polyethylene glycol in water before being cooled in a stepwise manner by an 1.0℃ decrements to -20℃ (A). The tubes were allowed to equilibrate at each designated temperature for 25 min, and the number of tubes frozen was determined (B). Ice nucleation activity (INA) was calculated as the temperature at which 50% of tubes were frozen (C).

高い値であった（第26図）。鱗片の氷核活性は秋から春にかけて $-4\sim-6^{\circ}\text{C}$ の間ではほぼ一定の値であった。それに対し、小花、包葉ではハードニング期である10月末から2月にかけて、それぞれ $-12.6^{\circ}\text{C}$ から $-6.0^{\circ}\text{C}$ 、 $-10.4^{\circ}\text{C}$ から $-5.6^{\circ}\text{C}$ と急激に活性が上昇した。2000年もほぼ同様の傾向であったが小花、包葉における氷核活性の上昇の時期が、前年よりも早まっていた。この年次の違いは、実験年度の気温の違いによるものだと考えられた。また、気温が上昇し低温耐性が減少するデハードニング期に、測定したいずれの部位についても厳冬期とはほぼ同程度の高い氷核活性を保っていた。

細菌による影響を除外するため、オートクレー

ブ後の氷核活性も測定したところ、枝において測定期間中わずかに低下した（第26図）。また、小花では測定開始した秋季においては、オートクレーブ後の氷核活性が約 $1.8^{\circ}\text{C}$ 低下したが、ハードニング後はその差が約 $1^{\circ}\text{C}$ に縮まっていた。鱗片、包葉において明らかな低下はみられなかった。これらのことから、ニホンナシの花芽においても氷核活性細菌による影響だけでなく、植物の組織によって、その活性にも差があることが示唆された。オートクレーブ後、枝において氷核活性が低下したが、これは試料の大きさが他の部位に比べ大きかったため、オートクレーブにより組織が破壊された際に漏れだした溶質が影響し、滅菌水を一回

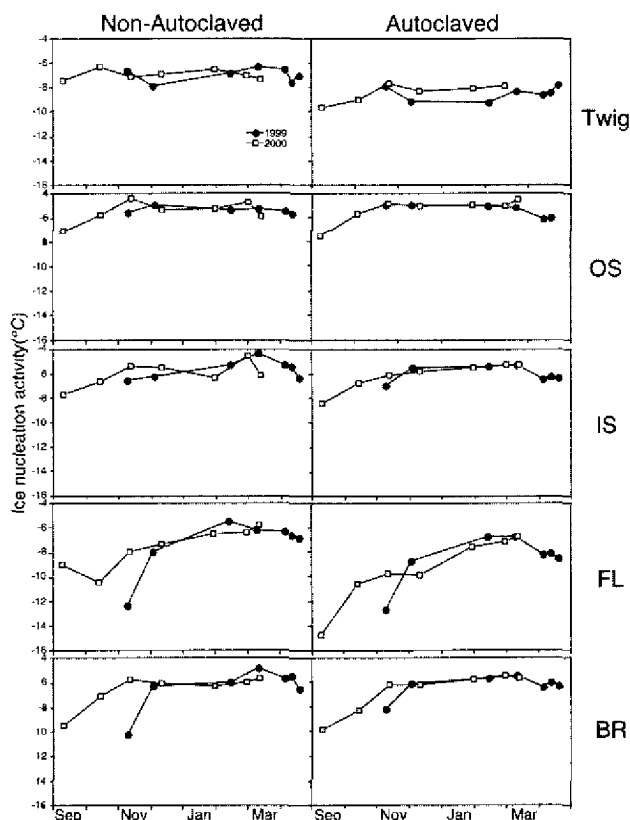


Fig. 26. Seasonal changes in ice nucleation activity (INA) before and after autoclaved of one-year-old twig or a winter bud component tissue; outer scales (OS), inner scales (IS), florets (FL) and bracts (BR) dissected from winter buds of Japanese pear 'Kousui' in 1999-2001. INA was measured using the tube nucleation assay with a total of 40 samples. The INA were calculated as the temperature at which 50% of tubes were frozen. Autoclaved; supposed to be eliminated the affect of bacteria.



取り替えただけでは不十分だったのかもしれない。小花において、ハードニングにつれてオートクレープ後の氷核活性の低下が少なくなったのは、小花に存在する氷核活性物質が熱により変成しにくくなったと考えられた。

この実験において鱗片では、小花に比べ氷核活性が比較的高かったことから、より氷晶形成を効率的に行う氷核物質が存在していると考えられた。Prestonら(1986)は、氷晶の形成温度と組織の重量間には対数関係があると報告している。小花や包葉の乾物重は鱗片に比べ小さく、このサンプルの大きさが過冷却や氷晶の形成に影響を与えた可能性も考えられた(第27図)。しかし、その大きさが他の組織に比べ著しく大きかったが、枝における氷核活性はそれほど高いわけではなく、組織における質的な氷核活性の違いもあると考えられた。

多くの植物で花芽内の小花の細胞は細胞外凍結する能力に乏しく、細胞内凍結を起こしやすい。しかし、凍結している周囲の組織からの氷晶の連鎖的な形成を防ぎ、器官ぐるみで器官内の水分を外部に氷晶として析出させ、凍結脱水を促進させる器官外凍結をしている(酒井, 1982)。示差熱分析の結果から、ニホンナシの花芽は器官外凍結を行わないと考えられてきた(Rajashekarら, 1982)。しかしKangら(1998)はニホンナシの花芽でも花芽は器官外凍結を行い、小花を過冷却させ低温傷害を回避していると報告している。本実験では厳冬期の2月に、花芽のついた枝を $-2^{\circ}\text{C}/\text{h}$ で温度を下げていき、凍結させると比較的高い氷核活性であった鱗片の間や包葉の周囲に氷晶が形成されているのが観察できた(第28図)。しかし、小花の細胞が細胞外凍結を起こしているのか、または花芽が器官外凍結することにより小花が過冷却しているのかは判定できなかった。

氷核形成の要因としては内的および細菌など表面に着生している外的要因が考えられており、越冬植物において観察される氷核活性は、それらを合計した氷核の形成しやすさとして表されている(Brushら, 1994)。今回の実験においては、植物の組織自身が細胞壁や細胞内に存在する内生の水

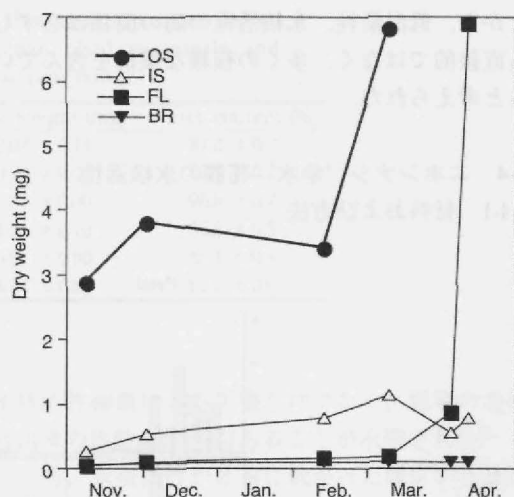


Fig. 27. Seasonal changes in dry weight of a winter bud component tissue; outer scales (OS), inner scales (IS), florets (FL) and bracts (BR) dissected from winter buds of Japanese pear 'Kousui' in 1999-2000.

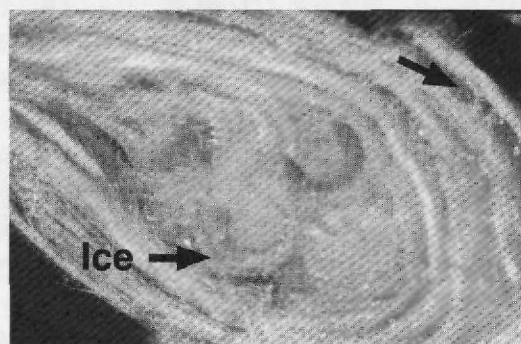


Fig. 28. A winter flower bud exposed to subfreezing temperature. Ice crystals were located in the space between florets and bracts and within scales where INA was fairly high.

核活性なのか、氷核活性細菌などの外生の要因によるものなのかは完全には区別できなかったが、ニホンナシの花芽はハードニングにともない、小花や包葉において氷核活性の上昇がみられ、氷核活性が花芽の低温による傷害に大きく関与していることが明らかとなった。しかしデハードニング中でも、花芽の氷核活性は高い活性を維持したこ

とから、低温耐性、氷核活性の間の関係は必ずしも直接的ではなく、多くの複雑な機構を含んでいると考えられた。

4-4 ニホンナシ ‘幸水’ 花器の氷核活性

4-4-1 材料および方法

氷核活性の測定は前節と同様に行った。供試植物は、筑波大学農林技術センター内で栽培されているニホンナシ品種 ‘幸水’ の花器を用いた。開花期の花器を花卉、雄ずい、雌ずい、花托、がく片、花柄に分解し、オートクレープ前後の氷核活性を測定した（第29図、第2表）。またそれぞれ

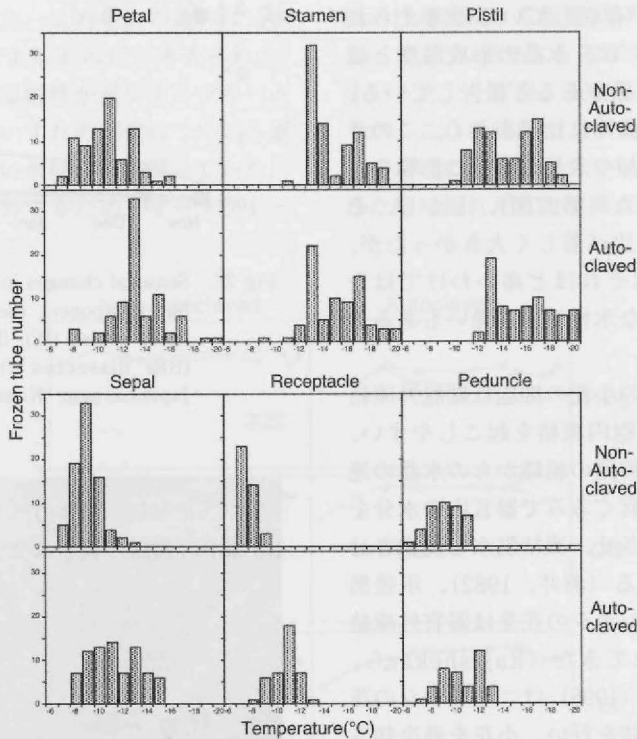


Fig. 29. Comparison of ice nucleation activity as expressed by frozen tube numbers before and after autoclaving assay of petals, stamens, and pistils, receptacles (including ovules), sepals and peduncles dissected from flowers of Japanese pear ‘Kousui’. A total of 80 tissue samples were used each experiment.

Table 2. Ice nucleation temperature of petals, stamens, pistils, receptacles, sepals and peduncles dissected from flowers of Japanese pear ‘Kousui’.

	Initial ice nucleation temperature(°C)		Ice nucleation activity(°C)	
	Non-Autoclaved	Autoclaved	Non-Autoclaved	Autoclaved
Petal	-7.3 ± 0.3 a	-9.8 ± 0.7 ab	-10.1 ± 0.4 b	-12.7 ± 0.3 ab
Stamen	-11.3 ± 0.9 b	-11.5 ± 0.9 bc	-14.1 ± 0.9 c	-14.7 ± 1.0 b
Pistil	-10.8 ± 0.4 b	-13.0 ± 0.7 c	-13.9 ± 1.2 c	-15.4 ± 1.4 b
Sepal	-6.8 ± 0.0 a	-8.3 ± 0.5 a	-8.4 ± 0.2 ab	-10.2 ± 0.6 a
Receptacle	-6.8 ± 0.0 a	-9.3 ± 0.5 ab	-6.9 ± 0.1 a	-10.2 ± 0.3 a
Peduncle	-7.3 ± 0.6 a	-7.8 ± 0.4 a	-8.2 ± 0.4 ab	-10.3 ± 0.7 a

Means indicated by different letters within a column are significantly different by Tukey-Kramer test (p=0.05). Values are means of four replications ± SE.

Table 3 Comparison of fresh and dry weight among flower components in ; petal, stamen, pistil, receptacle, and peduncle of 'Kousui' Japanese pear flower

	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	Water content (%)
Petal	16.32 $\pm$ 0.91	2.07 $\pm$ 0.11	87.3 $\pm$ 0.2
Stamen	1.11 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.01	81.7 $\pm$ 0.7
Pistil	0.53 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.00	96.6 $\pm$ 0.7
Sepal	10.24 $\pm$ 0.73	1.51 $\pm$ 0.10	85.2 $\pm$ 0.3
Receptacle	47.10 $\pm$ 5.59	6.91 $\pm$ 0.90	85.4 $\pm$ 0.4
Peduncle	55.75 $\pm$ 3.19	6.84 $\pm$ 0.61	87.8 $\pm$ 0.6

Values are means of six replications  $\pm$  SE.

の乾物重も測定した。氷核活性の測定はそれぞれの器官を20個体ずつ、4反復行った。

#### 4-4-2 結果及び考察

ニホンナシ '幸水' の開花期の花器においての氷核活性は、雄ずい-14.1 $\pm$ 0.9 $^{\circ}$ C、雌ずい-13.9 $\pm$ 1.2 $^{\circ}$ Cと非常に低かったのに比べ、花托、がく片、花柄はそれぞれ、-6.9 $\pm$ 0.1 $^{\circ}$ C、-8.4 $\pm$ 0.2 $^{\circ}$ C、-8.2 $\pm$ 0.4 $^{\circ}$ Cと高い活性を示した(第2表)。高い氷核活性を示した花托やがく片は、雌ずいや雄ずいよりも、より効果的に氷核を形成する物質を含んでいると考えられた。雌ずいや雄ずいの乾物重は、花托やがく片に比べ非常に小さく、前述したように質量や大きさの違いが、氷核の形成や過冷却に影響を与えたかもしれない。しかし、乾物重の大きい花托とがく片でも、氷核活性は同程度であり、組織における質的な氷核活性の違いも重要であると考えられた(第3表)。氷核活性が比較的高かったがく片・花托は、IRカメラでの観察(第4章1節)でのように、凍結試験中、花器の中で最初に凍結が始まる部位であり、ニホンナシ '幸水' 花器の凍結様式に、氷核活性が大きく関与していることが示唆された。オートクレープ後の氷核活性は、雄ずいを除いてすべての器官において1.5~3.3 $^{\circ}$ C低下した。しかし、がく片、花托、花柄は約-10 $^{\circ}$ Cと雌ずいや雄ずいに比べ氷核活性が高く、

氷核活性細菌による影響だけでなく、植物の各器官由来の活性にも差があることが示唆された。

一方、氷核活性がともに低かった雌ずいと雄ずいは、低温耐性の強さは前章で示したとおり、両者間で大きく異なっており、雌ずいよりも弱い部類に入るのに対し、雄ずいは比較的低温耐性が強かった。そのため雌ずいが低温環境下で傷害を受けやすいのは、雌ずい自体の氷核活性の影響よりも、すでに凍結した部位からの氷晶の連鎖的な形成により、雌ずいでも凍結が起これ、その結果傷害が発生してしまうことが考えられた。また過冷却中の代謝の異常など、他の機構による要因も推察された。氷核活性が高い花托やがく片は、花器の中でも凍結しやすい性質をもっており、前章で示したように凍結試験時にも傷害の兆候が最初に現れるが、その程度は比較的軽微であった。このことはこの器官が氷晶を形成しやすい性質とともに、比較的高い低温耐性を持っていることを示している。Carter (1999) が報告しているように、氷晶の伝搬を防ぐ障壁が無い場合は、最初の単一の凍結現象が次々の隣接する部位に氷晶は連鎖的な形成していく。したがってがく片や花托で形成された氷晶が連鎖的に形成され、組織間を伝わっていき、氷核活性は低いいため過冷却しやすいが、低温耐性も弱い胚珠や雌ずいに致命的な傷害を与えてしまうのかもしれない。

## 第5章 ニホンナシ‘幸水’の花器および幼果におけるジャスモン酸関連物質PDJ (*n*-propyl dihydrojasmonate) 処理による晩霜害回避の可能性

### 5-1 緒言

第3章の結果により、ニホンナシの花器における霜害は、氷晶の形成とその伝搬が主な原因と考えられた。低温耐性がない植物の細胞や組織は、致命的な細胞内凍結しやすく、そのため低温により傷害を受けやすい。ニホンナシの花器もデハードニングが進み、開花が近づくにつれて水分含量が増えるにしたがい、細胞内の溶質（主に糖）が減少するにともなって、低温耐性が減少して行くことが第2章において示されている。また、ニホンナシの花器においては、花器における生体膜脂質中の不飽和度が低下するにつれて低温耐性が低下するとも報告されている (Liaoら, 1997)。

霜害の回避や軽減は果実生産における重要な課題であり、危険地での栽培を回避し、被害に遭いにくい品種や樹種の選定などの栽培的対策が昔から行われてきた。また霜害発生の予報をもとに送風法や被覆法、氷結散水法、燃料法などの微気象の調節による防止法が、農家において一般的に行われている。しかし、晩霜の発生は自然現象であるために、完全に防ぐことは困難な場合が多い。植物成長調節物質による被害の軽減を目的とした研究も行われているが、まだ確実な効果を期待できるまでには至っていない (小林, 1985)。

これまでストレスに関与する植物ホルモンとしてアブシジン酸 (ABA) が広く研究されており、外生的なABA処理によって低温耐性を賦与できることがシロイヌナズナ (Mantylaら, 1995)、牧草の一種であるチャヒキ (Ishikawaら, 1990; Taninoら, 1990; Ishikawaら, 1995) などで行われている。しかし、ABAがどのような機構によって低温耐性を賦与しているかについてはあまり分かっていない。一方、植物成長調節物質の一つであるジャスモン酸は、ABAと似た生理作用を

示し、また傷害刺激やストレスのシグナル伝達物質としての役割も報告 (Seoら, 1999) されており、また低温傷害がメチルジャスモン酸処理で緩和 (Wang・Buta, 1994; Gonzalez-Aguilarら, 2000; Dingら, 2001, 2002) されており、ニホンナシの花器における低温ストレスに対しても有効に働く可能性が考えられた。そこで、本章ではジャスモン酸処理 (PDJ, *n*-propyl dihydrojasmonate) による晩霜害回避が可能であるかどうかについて検討した。

### 5-2 材料および方法

供試植物は、筑波大学農林技術センター内で栽培されている20年生ニホンナシ‘幸水’成木の花器と幼果を用いた。1999年4月9日 (展葉期)、4月15日 (花蕾期) に開花前の発育枝単位に、PDJ水溶液 (5および50ppm) を表面が全体的に濡れる程度にハンドスプレーで散布処理した。その後、花器または幼果を1999年4月18日 (花蕾期)、4月21日 (満開期)、4月30日 (幼果期) に採取し、実験材料とした (第30図)。凍結試験は第2章と同様に行った。すなわち採取した花器や幼果をポリエチレンの袋に入れ、5℃、0℃でそれぞれ30分ずつ予冷した後、5℃/hの冷却速度で-5℃まで冷却した。-5℃に達した時点ですぐに取

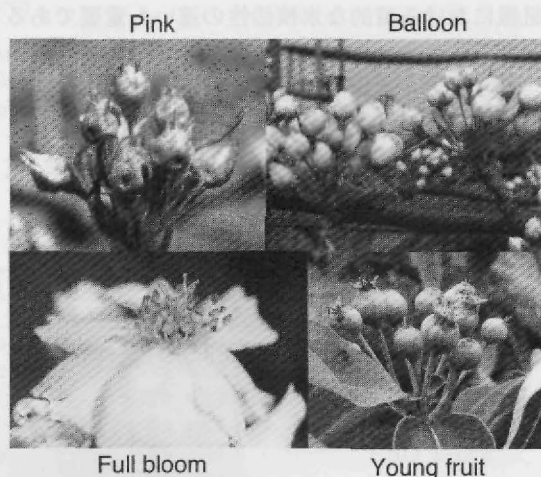


Fig. 30. Growth stages of 'Kousui' Japanese pear: pink, balloon, full bloom and young fruit.

り出し、0℃で融解し、5℃で一晩おいた後の電解質漏出量と褐変の程度を測定し低温耐性を評価した。褐変の程度は0から3までの4段階（0-褐変部無し、1-胚珠、雌ずいが褐変、2-花托、花柄まで褐変、3-全体が褐変）であらわした。2本の成木から採取した花そうはそれぞれ処理区ごとに、花そうから3～4番花を選び、電解質漏出率、褐変の程度ともに6花ずつ測定を行った。

また、2000年には4月16日（花蕾期）にPDJ溶液（5 ppm）を散布処理し、3日後の4月19日に結果枝ごと花器を採取し、凍結試験を行った。採取した結果枝は3花そうずつになるよう分断し、乾燥を防ぐため切り口にシリコンオイルを塗布し、氷とともにポリエチレンの袋に入れた。その後アルコールバスに設置した広口の試験管の中に入れた。その後5℃、0℃でそれぞれ30分ずつ予冷した後、2℃/hの冷却速度で-3、-5、-7℃まで冷却した。設定温度に達した時点で、それぞれ氷中で1時間、ゆっくりと融解し、5℃で一週間おいた後、花器を花弁、雄ずい、雌ずい、花托（がく片、胚珠を含む）、花柄に分解し、前述と同様、電解質漏出率は各処理区ごとに3サンプル、褐変の程度は10サンプルずつ測定を行い、低温耐性を評価した。

内生成分については凍結試験と同様の試料を遊離アミノ酸、糖、内生ABAについてそれぞれ測定した。測定方法は第2章3節で述べたとおりである。

実験に用いたPDJは植物体内でジャスモン酸と同様の生理作用を持ち、化学的に安定であるため圃場での処理に適しており、そして多くの場合ABAよりも低濃度でより高い効果を示すと考えられている（竹内・禰, 1997; Gemma, 2000）。

### 5-3 結果および考察

1999年の凍結試験の結果を第31図に示した。PDJ処理区は対照区に比べ、褐変の程度および電解質漏出率ともに低い値に抑えられた。花器全体での電解質漏出率は、花蕾期の対照区で37.9%に対し、PDJ処理区の平均値は16.6%であった。同様に満開期においても、PDJ処理は電解質漏出率

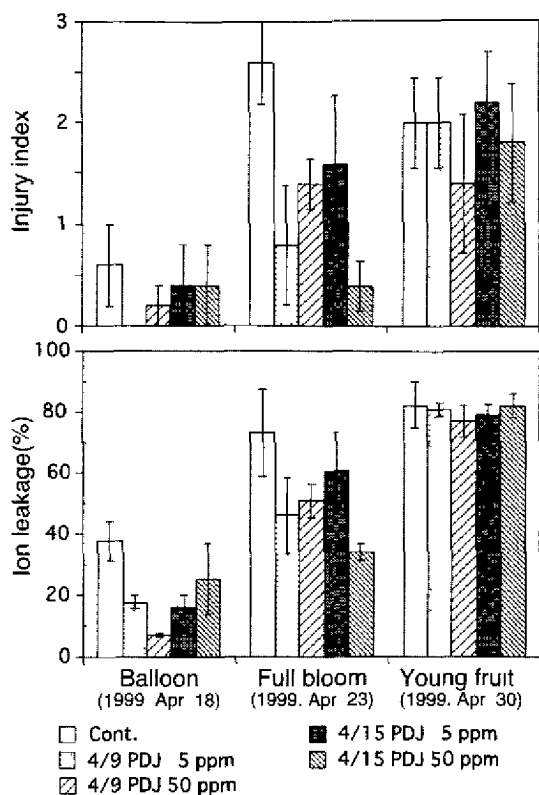


Fig. 31. Injury index and ion leakage (%) of PDJ-treated florets of 'Kousui' exposed to -5℃ for 1 h in 1999. Freezing injury was rated on a scale of 0 to 3 where 0=no injury, 1=ovule and pistil were damaged, 2=damage spread to receptacle and/or peduncle, 3=flower damaged completely. Vertical bars represent S.E. (n=6)

を73.1%から47.8%に抑えた。すなわち、PDJ処理が開花期の花器における低温に対する耐性を高める傾向が認められた。しかし、PDJ処理濃度や処理期に、一定の傾向を見出すまでは至らなかった。花蕾期（4月18日）の試験においては、4月9日のPDJ 5ppm散布処理で褐変が抑えられており、効果の高いことが伺えた。また、満開期（4月21日）においては、4月15日のPDJ 50ppm散布処理区が最も効果があった。なお、幼果期（4月30日）においては対照区、処理区間に有意な差は認められなかった。これが生育ステージの違いによるものなのか、それともPDJの処理時

期によるものなのかは、今のところ不明である。  
2000年の凍結試験、すなわち開花期における花

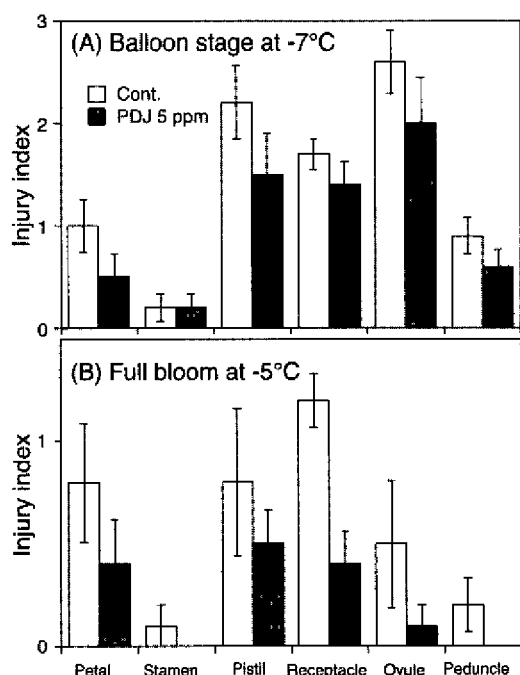


Fig. 32. Effects of PDJ-treatment on injury index of flower component organs; petals, stamens, pistils, receptacles (including sepals), ovule and peduncle of 'Kousui' in 2000. Florets at balloon stage were exposed to  $-7^{\circ}\text{C}$  (A) and in full bloom to  $-5^{\circ}\text{C}$  (B). Freezing injury was rated on a scale of 0 to 3 where 0=no injury, 1=water soaked and slight browning, 2=moderate browning, 3=the organ was completely damaged. Vertical bars represent S.E. ( $n=10$ )

蕾期、満開期の花器の構成器官ごとの電解質漏出率を第4表に示した。特に満開期のPDJ処理した花托と花柄において、 $-5^{\circ}\text{C}$ の凍結試験後、52.6%から22.3%、40.0%から19.6%へと、電解質漏出率が減少していた。同様に褐変についても、花蕾期および満開期ともにPDJ処理は全体的に傷害を抑える傾向であった(第32図)。前章で述べたように、凍結試験において、まず花托の表皮の下に空洞ができる浮き皮がおこり、胚珠や雌ずいにおいて褐変の傷害がみられ、温度の低下とともに花柄などにも傷害が拡がっていった。ニホンナシ '幸水' の花器の各構成器官は、それぞれ凍結に対する感受性が異なると考えられたが、PDJ処理は全体的に花器の低温耐性を高め、低温傷害を緩和した。

以上のように、ニホンナシ '幸水' の花器における低温の被害は、PDJ処理によって緩和される傾向にあった。

#### 遊離アミノ酸・糖含量

ニホンナシ '幸水' の花器の遊離アミノ酸含量を第5表に示した。第2章2節で示したように11種のアミノ酸について検出、同定できた。PDJ処理は花(花弁、雄ずい、雌ずい、がく片、花托を含む花柄を取り除いたもの)および花柄において、明らかにプロリン含量を増加させた。特に花においては対照区で $4.84 \mu\text{M/gFW}$ であったのに対し、PDJ処理区においては $8.82 \mu\text{M/gFW}$ と約2倍に増加した。反対にアスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニンは、PDJ処理により減少した。

Table 4. Comparison of cold tolerance among different parts of 'Kousui' Japanese pear flower as expressed by ion leakage (%).

	Treatment	Ion leakage (%)				
		Petal	Stamen	Pistil	Receptacle	Peduncle
Balloon stage at $-7^{\circ}\text{C}$	Cont.	$35.7 \pm 1.7$	$31.7 \pm 4.0$	$62.3 \pm 14.9$	$87.1 \pm 11.9$	$80.2 \pm 3.3$
	PDJ 5ppm	$19.1 \pm 3.9$	$18.8 \pm 2.1$	$43.8 \pm 7.5$	$74.5 \pm 14.0$	$76.5 \pm 9.9$
		*	NS	**	NS	NS
Full bloom at $-5^{\circ}\text{C}$	Cont.	$22.4 \pm 3.7$	$40.8 \pm 8.1$	$31.9 \pm 3.4$	$52.6 \pm 10.4$	$40.0 \pm 6.1$
	PDJ 5ppm	$21.1 \pm 1.7$	$28.2 \pm 6.1$	$26.8 \pm 5.9$	$22.3 \pm 6.8$	$19.6 \pm 3.2$
		NS	NS	NS	**	*

NS, \*, \*\*. Nonsignificant or significant at  $P < 0.05, 0.01$  by Student's t-test. Petals, stamens, pistils, receptacles, and peduncle dissected from blooming flowers. Values are means of three replications  $\pm$  SE.

花柄ではグリシンとアラニンが減少した。

第6表に示すように、1999年のPDJ処理はニホンナシ‘幸水’の花器、特に花（花柄以外の部位）において明らかに糖含量を上昇させた。すなわちソルビトールは0.79mg/gFWから6.81mg/gFWへ、スクロースは3.99mg/gFWから20.56mg/gFWへ上昇した。花柄部では花よりは顕著ではなかったが、同様に糖含量がPDJ処理により上昇する傾向があった。

次に花器の各構成器官は、それぞれ凍結に対する感受性が異なるので、第7表が示すように花器の構成部位ごとの糖含量を調査した。測定したいずれの器官においても全糖含量は、PDJ処理によって増加する傾向を示した。特に花托（胚珠、子

房を含む）、雌ずい、花柄において、明らかに全糖含量が上昇した。個々の部位でみると、PDJ処理によってスクロースが雌ずい・花柄で、グルコースは花托において明らかに増加した。花卉においてはフルクトースが上昇し、ソルビトールは雌ずい、花托において増加した。第3章で示したように低温試験における傷害を受けやすかった雌ずい、花托（胚珠を含む）では全糖含量、ソルビトール、グルコース含量が他の部位に比べ低かったが、PDJ処理は雌ずい、花托で全糖含量を明らかに増加させた。特に花托においては、グルコースが7.10mg/gFWから14.20mg/gFWと2倍になっており、ソルビトールも明らかに増加した。

ストレス条件下での植物では、ある種のアミノ

Table 5. Effect of PDJ treatment on free amino acid content of ‘Kousui’ Japanese pear flower at balloon stage.

	Free amino acid content ( $\mu$ M/g fresh wt.)					
	Flower			Peduncle		
	Cont. PDJ 5 ppm			Cont. PDJ 5 ppm		
Asparatic acid	3.22	2.33	*	2.69	3.18	NS
Glutamic acid	4.94	3.68	*	2.69	2.75	NS
Proline	4.84	8.82	*	0.16	0.23	**
Glycine	0.28	0.26	NS	0.99	0.29	*
Alanine	0.86	1.27	NS	1.64	0.77	*
Valine	0.81	0.65	NS	0.72	0.46	NS
Isoleucine	1.09	0.94	NS	0.57	0.27	NS
Phenylalanine	0.51	0.39	*	0.54	0.22	NS
Histidine	0.63	0.43	NS	0.43	0.15	NS
Lysine	0.16	0.11	NS	0.14	0.04	NS
Arginine	0.75	1.27	NS	0.24	0.14	NS
Total	18.09	20.15	NS	11.26	8.51	NS

NS, \*, \*\*. Nonsignificant or significant at  $P < 0.05, 0.01$  by Student's t-test. Values are means of four replications.

Table 6. Effects of PDJ treatment on sugar content of ‘Kousui’ Japanese pear

		Suger content (mg/g fresh wt)				
	Treatment	Fructose	Glucose	Sorbitol	Sucrose	Total
Flower	Cont.	0.20 ± 0.06	0.28 ± 0.05	0.79 ± 0.14	3.99 ± 0.76	5.27 ± 0.98
	PDJ 5 ppm	1.08 ± 0.28	2.49 ± 0.51	6.81 ± 0.17	20.56 ± 3.99	30.93 ± 4.59
		*	*	***	*	**
Peduncle	Cont.	0.22 ± 0.04	0.37 ± 0.07	2.64 ± 0.36	5.69 ± 1.74	8.16 ± 2.34
	PDJ 5 ppm	0.49 ± 0.13	1.86 ± 0.41	4.54 ± 1.32	11.08 ± 3.56	17.97 ± 4.32
		NS	*	NS	NS	NS

NS, \*, \*\*, \*\*\*. Nonsignificant or significant at  $P < 0.05, 0.01, 0.001$  by Student's t-test. Values are means of four replications  $\pm$  SE.

Table 7. Effects of PDJ treatment on sugar content of 'Kousui' Japanese pear flower in 2001.

	Treatment	Sugar content (mg/g fresh wt)					
		Raffinose	Sucrose	Glucose	Fructose	Sorbitol	Total
Petal	Cont.	1.84 ± 0.48	1.87 ± 0.35	10.34 ± 0.56	21.25 ± 0.41	10.30 ± 0.43	45.29 ± 1.19
	PDJ 5 ppm	0.95 ± 0.24	5.07 ± 1.94	16.28 ± 3.51	24.50 ± 1.37	10.68 ± 0.92	57.00 ± 6.60
		NS	NS	NS	*	NS	NS
Stamen	Cont.	1.72 ± 0.38	6.65 ± 0.56	8.93 ± 1.21	7.51 ± 0.49	2.98 ± 0.39	27.51 ± 1.12
	PDJ 5 ppm	1.64 ± 0.47	5.36 ± 1.00	13.18 ± 3.47	10.41 ± 1.57	4.40 ± 0.28	34.72 ± 6.10
		NS	NS	NS	NS	*	NS
Pistil	Cont.		1.56 ± 0.16	9.32 ± 1.09	6.85 ± 1.01	3.34 ± 0.53	21.07 ± 2.41
	PDJ 5 ppm	3.22 ± 0.97	3.64 ± 0.45	12.68 ± 1.66	8.46 ± 1.03	3.96 ± 0.74	31.42 ± 3.22
			*	NS	NS	NS	*
Sepal	Cont.	0.60 ± 0.08	2.45 ± 0.69	12.09 ± 0.74	11.64 ± 0.60	12.03 ± 0.46	38.71 ± 1.83
	PDJ 5 ppm	2.24 ± 0.76	2.89 ± 0.42	15.21 ± 1.96	11.45 ± 0.60	11.03 ± 0.76	42.34 ± 3.14
		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Receptacle	Cont.	0.69 ± 0.21	3.31 ± 0.42	7.10 ± 0.43	6.37 ± 0.78	5.21 ± 0.34	22.46 ± 1.23
	PDJ 5 ppm	0.81 ± 0.15	4.84 ± 0.75	14.20 ± 1.65	8.49 ± 1.01	6.27 ± 0.28	33.54 ± 2.37
		NS	NS	**	NS	*	**
Peduncle	Cont.	1.00 ± 0.18	1.29 ± 0.33	5.80 ± 0.44	3.88 ± 0.32	17.93 ± 1.26	29.57 ± 1.35
	PDJ 5 ppm	2.59 ± 0.94	2.51 ± 0.11	9.54 ± 1.76	4.81 ± 0.47	17.49 ± 1.04	36.50 ± 2.21
		NS	*	NS	NS	NS	*

NS, \*, \*\*. Nonsignificant or significant at  $P < 0.05, 0.01$  by Student's t-test. Values are means of six replications  $\pm$  SE.

酸含量が増加することが報告されている (Kozukueら, 1984; Szalaiら, 1997). 高等植物におけるアミノ酸の集積が, ストレス反応なのかは不明であるが, この溶質の集積は浸透圧を調節していると考えられている (Bohnertら, 1995). カンキツの葉中において低温処理の間, プロリン含量は上昇し (Kushad・Yelenovsky, 1987), また低温処理したトウモロコシでは葉のアミノ酸含量が増加している (Szalaiら, 1997). また, プロリンは水に非常に溶けやすく, 高い凍結防御作用を持っていることが知られている (Withers・King, 1979).

糖もアミノ酸同様, 低温耐性に大きく関与していることが知られている. 糖の中ではグルコースが最も凍害防御効果が高く, ソルビトール, ラフィノースも高い効果を示す (酒井, 1982). 今回の実験においても, 低温試験によって傷害を受けやすかった雌ずい, 花托, 胚珠において, ソルビトール, グルコース含量が他の部位に比べ低く, 全糖含量も比較的低い値であった. 一方, 花器においてはソルビトール, グルコースがPDJ処理により増加した. ソルビトールはプロリン同様, 細胞内で浸透圧を調節する働きのある適合溶質 (中

村・高倍, 1999) として役割を担っている. Sasakiら (1998) によれば低温耐性の変化に伴う水ストレスが低温馴化, 脱馴化中の糖含量の変化と関係しているという.

果樹の花器が氷点下の低温に遭遇した場合, 花器は過冷却することで生存することができる (Carterら, 1999). エテホン処理したモモ花芽は雌ずいのソルビトールおよびスクロース含量が増加し, その結果, 低温耐性が賦与された (Durner・Gianfagna, 1991). 本研究におけるニホンナシの花器においてもプロリン, ソルビトールおよび全糖含量がPDJ処理により増加した. 水溶性のプロリンやソルビトールなどの適合溶質の集積は細胞液の凍結温度を低下させ, 植物の過冷却する能力を変化させるので, ニホンナシ花器において過冷却により, 凍結が回避された可能性が示唆された. また, 凍結やそれに伴う脱水の際にも, 原形質膜やタンパク質がこれらの溶質により保護 (Sakai・Yoshida, 1968; 吉田, 1999) されたかもしれない. PDJ処理は明らかに糖含量を増加させたが, 全アミノ酸量はそれほど変化しなかった. したがってPDJ処理による低温傷害の緩和は, アミノ酸よりも糖の影響が強く表れたと考え



られた。

### 内生ABA含量

開花期の花における内生のABA含量は、非常に微量で1999年には検出することができなかった。花柄においては花蕾期から満開期とステージが進むにしたがって、144.1ng/gFWから672.9ng/gFWとABA含量が増加した。PDJ処理は、花蕾期では757.9ng/gFW、満開期には661.9ng/gFWであり、ABA含量を上昇させた(第8表)。

また、花器の部位ごとに測定したところ、検出できた範囲では、PDJ処理はいずれの部位でもABA含量を増加する傾向を示した、とくにがく片においては顕著であった。(第33図)。

低温耐性とABAの関与については、いくつかの植物の低温耐性を明らかに増加させ(Chen・Gusta, 1983; Langら, 1994), また低温順化処理によって低温耐性が高まるジャガイモの品種では、内生のABAが増加し、低温耐性が高まらない品種では内生のABAが増加しない(Chenら, 1983)。さらに乾燥処理はABA含有量を増加させることが知られているが、乾燥処理によってシロイヌナズナは低温耐性が高まることが、Langら(1994)によって報告されている。低温処理の代わりに、外生的なABA処理によっても、シロイヌナズナの低温耐性が獲得されている(Mantyla

ら, 1995)。同様の結果は、牧草の一種であるチャヒキ(Ishikawaら, 1990; Taninoら, 1990; Ishikawaら, 1995)などで得られている。

低温試験後の傷害を抑制できたPDJ処理区のABA含量は、対照区に比べ比較的高い傾向が示された。また、部位間で比較すると同一器官同士での比較では、傷害が少ない区ほどABA含量が高かった。ABA含量が高かったがく片では、あまり傷害の様子が見られなかったが、花柄に比べ

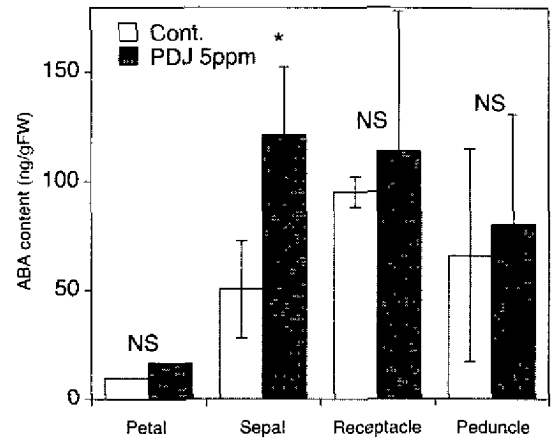


Fig. 33. Effects of PDJ-treatment on ABA contents of flower component organ: petals, sepal, receptacles, and peduncle of 'Kousui' in 2000. NS, \*. Nonsignificant or significant at  $P<0.05$  by Student's *t*-test. Vertical bars represent S.D. ( $n=3\sim5$ )

Table 8. Effects of PDJ treatment on ABA content in 'Kousui' Japanese pear flower at different stages. Flower (petals, stamens, pistils, sepals and receptacle), fruit and peduncle were dissected from flower clusters.

Treatment	ABA content (ng/gFW.)					
	Balloon (1999. 4.18)		Full bloom (1999. 4. 23)		Young fruit (1999. 4. 30)	
	Flower	Peduncle	Flower	Peduncle	Flower	Peduncle
Cont.	—	144.1	—	520.3	1092.5	628.0
4/9 PDJ 5ppm	—	479.2	—	205.4	2081.2	665.8
4/9 PDJ 50ppm	—	1252.7	—	1141.5	784.4	426.2
4/15 PDJ 5ppm	—	770.8	—	904.3	1253.1	284.9
4/15 PDJ 50ppm	—	529.1	—	396.5	1444.1	328.4
Significance						
day	—	NS	—	NS	NS	*
concentration	—	NS	—	*	*	NS
day × concentration	—	**	—	**	**	NS

NS, \*. \*\* Nonsignificant or significant at  $P<0.05$ , 0.01 by ANOVA

ABA含量の高い花托では花柄よりも傷害を受けやすかった。このことから、花器の部位ごとにABAに対する感受性が異なることが示唆され、部位間の低温耐性の差異は、ABA含量のみの一元的な解釈では説明できないことが分かった。

ABAは、果実を含む様々なシンク器官への、糖の蓄積を促進することが知られており（近藤，1994；小橋，1998；Kobashi，2000），またモモ果実においては、ソルビトール、フルクトース、グルコースの取り込みがABAによって、能動輸送・拡散の両方の経路で促進されていることが分かっている（小橋，2000）。したがって今回の実験においても、ニホンナシの花器においての糖含量の増加は、ABAによる影響である可能性も考えられた。さらにメチルジャスモン酸処理したズッキーニ果実の外果皮では、対照区果実よりも高いABA含量であり（Wang・Buta，1994），同様にPDJ処理により内生のABA含量が増加することはカキ（Gemmaら，1998），ブドウ（東川，1998）で報告されている。したがって、PDJ処理は花器において内生ABA含量を高める傾向があったので、PDJ処理の効果はABAを介して行われている可能性も高い。

さらに、ジャスモン酸類はストレス反応におけ

るシグナル伝達のカスケードで重要な役割を果たしている。加えて、その生合成経路を考えるとジャスモン酸は原形質膜のリノレン酸から合成される。細胞は低温にさらされると、生体膜の一部が液晶層からゲル層に転移する。この生体膜の相転移は膜の流動性を低下させ、膜透過性や膜タンパク質の活性に大きな影響を与える。生体膜の相転移温度は膜脂質の不飽和度に規定されている（三上・村田，1999）。このように脂質は、凍結時の原形質膜の安定性に大きく関与している。PDJが原形質膜を構成している脂質の状態を変更し、凍結時の膜の安定性に影響を与えたのかもしれない。

一方、第3章で示したように、花器における氷晶の形成とその伝搬は、傷害の様子に大きく関わっており、この凍結様式を制御することは、植物における低温耐性の重要な機構である。PDJ処理は溶質を増加させ、花器中の組織や器官における過冷却を促進し、さらに凍結脱水時に細胞膜を損傷から保護していると考えられた。またPDJ処理は、氷核形成の温度や氷晶の伝搬する経路に影響を与え、凍結様式を変更し、ニホンナシ‘幸水’の花器を低温による傷害から保護しているのかもしれない。

## 第6章 総合考察

本研究は、ニホンナシ‘幸水’の開花期や、その後の果実肥大初期における晩霜害の回避や軽減のため、凍霜害発生機構および植物成長調節物質PDJの利用による晩霜害防止の可能性について研究した。第2章ではニホンナシ‘幸水’のハードニング・デハードニング過程を調査し、第3章では開花期の低温耐性を、第4章では花器の凍結機構とそれを制御する氷核活性について調査した。そして第5章ではPDJ処理による晩霜害回避の可能性についてそれぞれ検討した。

まず第2章において、ハードニング～デハードニングにともなう、ニホンナシ‘幸水’の低温耐性と溶質の季節変化を中心に検討した。秋から冬、冬から春にかけて気温の変動とともに、ニホンナシ‘幸水’の低温耐性は上下変動した(第34図)。また低温耐性の強さは、同一植物体でも部位ごとに異なっていた。‘幸水’の花芽においては、10月中旬には低温耐性が上昇していき、気温が上昇し始める3月に入り、芽の代謝活性がしだいに活

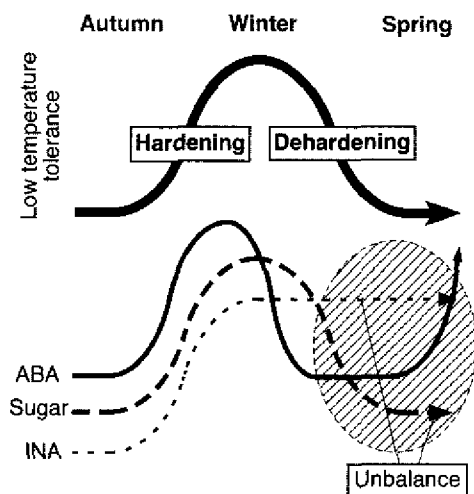


Fig. 34. Model of changes in low temperature tolerance, abscisic acid, sugar, and ice nucleation activity in floret of 'Kousui' Japanese pear during hardening and dehardening.

発になってくると、急激に低温に対する耐性が弱まった。また水分含量と低温耐性との関係を調べたところ、水分含量の上昇と低温耐性が減少し始める時期は、ほぼ一致しており、生体内における水分含量が低温耐性と関係していることが確かめられた。Kangら(1998)がカキにおいて、芽の伸長量および水分含量と、低温耐性の強さについて報告しているが、今回得られた結果は同様の傾向を示すものであった。しかし花芽とは異なり、枝におけるジン皮部、材部については水分含量と低温耐性の間に明瞭な関係は確認されなかった。堀本ら(1999)はクリにおいて、枝水分および木部圧と芽の低温耐性の関係を調査しており、枝水分あるいは導管水の増加が、凍害を誘発する要因になっていると報告している。本実験においては、枝水分と枝自身の低温耐性の強さの間には、はっきりとした相関はみられなかった。しかし、花芽の低温耐性の低下は枝、特にジン皮部における水分含量の上昇に遅れて起こっており、根からの吸水が活発になり、樹の上部に水が送られるようになると、花芽における低温耐性が急激に失われることが示唆された。

花芽が萌芽し、花が開花する時期においては、低温により著しい被害を受けることが、今回の実験においても確かめられた。ニホンナシでは‘二十世紀’において、Liaoら(1996, 1997)が同様の報告をしているが、‘幸水’においても開花とともに、すみやかに低温耐性が失われることが示された。本実験ではハードニング・デハードニング過程での凍結試験後の電解質漏出量をもとに、花芽の低温耐性の強さを判定したため、組織間の低温耐性の差や、致命的な被害部位を特定するまでには至らなかった。

低温耐性の評価法には様々な方法があり、目的にかなった方法の選択が必要である。細胞の傷害の判定には蛍光色素法(Wildholm, 1972)が用いられる。組織の相対的な被害度を知るためには、組織浸出液の電気伝導度(Dexterら, 1932)やアミノ酸量(Siminovitchら, 1964)を測定することが一般的に行われている。培養細胞や組織切片の場合では、トリフェニール・テトラゾリウム

クロライド (TTC) に対する還元力を調べる方法が、有効であると考えられている (Steponkus・Lanphear, 1967)。また、最近では赤外線温度計やNMRを用いて、固体内の組織間の低温耐性の差や、致命的な被害部位を調査することも行われている。耕種上の観点からは、鉢植え苗を用いて、凍結融解してから以後の花および果実の様子を調査することが、回復力を含めた被害の程度を知るのに最も適当である。また被害の程度の評価法には、植物または組織の最低生存温度、または50%致死温度により評価する方法や、被害度を数段階に分けて評価する方法がある。このようなことをふまえて、低温耐性の測定法および評価法の選択については、今後さらに検討する必要があると考えられた。

ハードニング・デハードニングの過程において、様々な物質代謝や細胞構造の変化が起こることにより、植物は夏から冬、冬から夏の状態へと順次適応していく (匂坂, 1974; 酒井, 1982)。ニホンナシについてもそのことを明らかにするため、低温耐性の変化が明瞭であった花芽における、遊離アミノ酸、糖などの物質変化について調査を行った。

遊離アミノ酸の変化を調べたところ、ハードニング過程においてアルギニンは上昇してピークを迎え、その後デハードニング過程では急激に減少していた。反対にハードニング中、アスパラギン酸は減少し、デハードニング過程においてはグルタミン酸と同時期に急激な上昇が認められた。Sagisaka (1974) は生長期にある植物では、グルタミン酸の量が非常に多いが、冬季にはアルギニンが増加すると報告している。このグルタミン酸からアルギニン、アルギニンからグルタミン酸へ、主要なアミノ酸の種類が入れ替わることは、植物が夏から冬、冬から夏の状態に変化する過程で起こりえる代謝の転換と考えられる。さらに本実験では、気温が上昇し萌芽が近づくと、他のアミノ酸も急激に上昇しているのが確認され、花芽の萌芽、開花と続く一連の急激な植物活動の開始がうかがえた。植物の中には越冬中のアミノ酸として、アルギニンの他にプロリンを蓄積するものも知ら

れている (酒井, 1982)。プロリンは水に非常に溶けやすく、高い凍結防御作用を有することが知られているが (Withers・King, 1979)、ニホンナシ‘幸水’の花芽中にはハードニング過程においては、ごくわずかしかな存在してなく、デハードニング過程においても、他のアミノ酸同様、開花直前に急激に上昇し、冬季の花芽の低温耐性にはあまり関係がないようであった。

糖においては、ニホンナシ‘幸水’の花芽においても他の植物同様に、低温耐性の高まりと密接に関わっていることが示された (第34図)。このことから、ニホンナシ‘幸水’の花芽においても他の植物と同様に、細胞内に多量の糖を蓄積することによって浸透圧を増加させ、モル氷点降下により一定温度での凍結脱水の程度を緩和させている (吉田, 1999) と考えられた。ニホンナシはソルビトールを転流糖とするバラ科の植物であり、花芽においても大きな割合を占めていた。ソルビトールはハードニングにおいて低温耐性の高まりと平行して増加していき、デハードニングにおいては急激に減少した。このことからニホンナシの花芽では、ソルビトール、さらにはスクロースが主要な糖であり、低温耐性とも強い相関が認められた。しかし、花芽の構成器官ごとにみると、その増減の様子は少し異なっていた。ハードニングでのソルビトールの集積は小花から先に起こっており、包葉+内部鱗片、外部鱗片と花芽の外側に向かって、遅れて順に集積していった。その量も小花が最も多く、厳冬期には他の器官の約2倍の量であった。また、多くの植物において冬季にラフィノースやスタキオースの蓄積が報告 (酒井, 1982) されているが、ニホンナシの花芽においてラフィノースはハードニング、デハードニングを通して、低い値で一定であった。しかし、外部鱗片においてはハードニング過程においてスタキオースの蓄積が認められた。Flinnら (1995) はレンギョウ花芽において、ラフィノース、スタキオースと低温耐性の間に強い相関があることを報告している。しかし糖質の中で大きな割合を占めていたのはグルコース、フルクトースであり、このことからラフィノース、スタキオースの増減、特

にラフィノースは低温耐性の良い指標としては有効であるが、ニホンナシの花芽においては低温耐性での役割は不明瞭であった。

Langら (1994) はシロイヌナズナにおいて、ABA濃度と低温耐性の強さとの間に正の相関があると報告している。またABAの濃度を高める乾燥処理によっても低温耐性が高まるとの報告も多数ある (Guyら, 1992; Langら, 1994; Mantylaら, 1995)。また、シロイヌナズナにおけるABA欠損株では、低温順化处理を行っても低温耐性が高まらないこと (Langら, 1994)、低温誘導性のタンパク質や遺伝子がABAによっても誘導されること (三上・村田, 1999) も報告されており、低温耐性獲得において、ABAは重要な役割を果たしていると考えられる。

花芽全体では、低温耐性の強さとABA濃度との間には直接的な関係がみられなかった。ABA含量がピークを迎えた3月上旬の低温耐性は、厳冬期である2月に比べ著しく高いわけではなく、むしろ急激に低温耐性が弱まる直前である。田村ら (1993) はニホンナシ '二十世紀' で自発休眠中のABAの変化を測定しているが、芽中のABA含量が低温遭遇にともない低下し、また遭遇する低温の強さによって、ABAの低下する時期が異なることも報告している。また気温が低く、低温耐性が高いと予想される時期に必ずしもABA含量が増加するわけではなく、このことからデハードニング中におけるニホンナシの芽の低温耐性の強さとABA含量との間には、直接的な相関関係はないと考えられた。より詳細に調査するため、花芽中の小花における内生のABA含量の変化を精査したところ、ABA含量はハードニングに伴い上昇していき、12月上旬にピークを迎えた後、萌芽直前まで減少していった。これはほぼ自発休眠の深さに対応しており、ABAが密接に花芽の休眠を制御していることが示唆された。温帯落葉樹の芽の休眠と低温耐性とは、複雑に関係していると考えられている。Irvingら (1967) は、ネグンドカエデにおいて低温耐性の獲得にとって自発休眠は必ずしも必要でなく、植物が休止状態になっていることが必要であることを報告している。

また栄花・酒井 (1973) は、木の冬芽の自発休眠が破れた後に低温耐性が急速に高まるが、休眠中のものを12℃以上の温度においた場合、休眠は破れないし、低温耐性も高まらなると報告している。これらのことから低温耐性のある程度以上に高めるには、低温によって自発休眠を解除し、ABA含量を低下させることが必要であると酒井 (1982) は考えている。ニホンナシ '幸水' においても、小花においてABAの減少が始まった後、気温が上昇するまで獲得した低温耐性を維持していた (第34図)。また、Chenら (1979) はABAが低温の代替作用をし、ABAがあるレベルに達すると低温馴化が始まると考えている。これらのことから、ABAはハードニングの開始には必要であるが、その後は低温耐性とは関係していないのかもしれない。

ところで、ABAは植物の乾燥時における気孔の閉鎖において重要な役割を果たしており (近藤, 1994)、ヒマワリにおいては根あるいは頂芽にABAを処理することにより、根から茎への水の移動が促進されたとの報告もあり (Ludewigら, 1988)、植物の水分状態と密接に関与している。花芽全体でみたとき、ABAのピークを迎えている時期は、花芽における水分含量が増加する直前である。このころから、花芽において鱗片の基部周辺の木化していない組織が成長を始め、また小花においても大きさが大きくなり、花芽が萌芽し始める時期にABAが急激に上昇した。以上のように、花芽におけるABAの含量が増加することにより、花芽の肥大に伴う根から花芽への水の移動を促進している可能性が考えられる。このように、花芽におけるABAの作用機構は、ハードニング過程とデハードニング過程で異なっていると考えられた。

次に、開花期の花器や幼果における低温耐性について考察してみたい。デハードニング後の花の開花現象は、活動が盛んな時期であり、この時期の低温遭遇は、植物にとっても重大な脅威であり、また低温による傷害を著しく受けやすい、実際のニホンナシ果実生産の現場においても、晩霜は注意すべき気象災害であることが以前から警鐘され

てきた。ニホンナシの花器においては開花前後、低温に最も弱いのは雌ずいや胚珠であると考えられてきた(猪俣ら, 1993; 猪崎, 1985)。今回の実験においても、ある程度の低温(-3℃)以下に遭遇させた場合、被害が大きかったのは雌ずいや胚珠であったが、しかし、低温環境下でこれらの部位に最も早く傷害の様子が現れるわけではなかった。低温試験中、まず初めに傷害が確認されたのは花托部であり、浮き皮と呼ばれる傷害がみられた(第17図)。これは花托の表皮の下に空隙を持つ現象であるが、実際の栽培においても軽微な霜害の症状として確認されている。特に開花期の始め、展葉期の直後あたりまではこの傷害が起こっても組織は回復し、果実の品質にはあまり影響は与えない。花托において浮き皮が確認された後、胚珠や雌ずいが褐変することが確かめられた。胚珠や雌ずいの傷害は受精、受粉と続く一連の生殖活動にとって致命的である。褐変の程度や電解質漏出率で傷害の程度を判定したが、今回は切り枝を用いた凍結試験であり、褐変の程度が軽微であっても、その後の生殖や果実肥大などに与える影響は確認できなかった。しかし、これらの部位は花托などに比べて、褐変の程度や電解質漏出率が低い値であっても、その後の果実栽培における影響ははるかに大きいと思われる。

冬季のニホンナシ花芽のハードニング・デハードニングにおいて、糖が低温耐性に大きく関与していることが示されたが、開花期の花器においても糖は低温による傷害に関与していると考えられる。花器中の各器官の糖の種類と含量を測定したところ、傷害を受けやすかった雌ずい、花托(胚珠を含む)において、ソルビトール、グルコース含量が他の部位に比べ低い傾向であった。そして果樹の花器が氷点下の低温に遭遇した場合、花器は過冷却することで傷害を受けることを回避している(Carterら, 1999)ので、花器における傷害を受けやすい部位は、不十分な浸透圧のために氷点を降下し得る過冷却状態になかったと考えられた。

氷晶の形成は凍結傷害の前提条件であり、低温耐性や霜害の非常に重要な要因である。次に、ニ

ホンナシ‘幸水’の花芽および花器の凍結様式について調査した。

これまで植物の凍結機構、また凍結傷害の機構について調査する際、凍結試験後の傷害の様子からその傷害過程を推定するか、また示差熱分析法により、ある1点での凍結の過程を調査し、その点を増やすことによって全体像を類推してきた。今回はニホンナシの花器の凍結を観察するために、赤外線サーモグラフィを使用した。凍結様式を調査する上で大変有効であることが示され、花器における凍結の開始からその伝搬までを確認できた。植物の凍結を計測する方法には、示差熱分析法(Ashworthら, 1985; Quammeら, 1972, 1995)や顕微鏡による観察(Ashworthら, 1989; Pearce・Willson, 1985; Quamme, 1978)、NMRを使った観察(Priceら, 1997ab; Ishikawaら, 1997, 2000)などが挙げられる。しかし花芽などの複数の器官で構成されるものや、同一の器官が複数存在する場合において示差熱分析法では、個々の部位が凍結した際の発熱をそれぞれ検出するため、凍結が始まった部位を特定することが困難であった。さらに熱伝対などを植物体の表面に接触または体内に挿入する必要があり、また、熱伝対が氷晶の形成源になってしまう問題もある。超低温SEMの使用は、細胞外凍結の様子なども詳細に観察することができる(Malone・Ashworth, 1991)ので、凍結の結果を観察するには有効であるが、やはり凍結過程を観察するのが難しい。NMRイメージング法は水(のプロトン)を対象とし、粘度の低い水だけが画像化され、氷になるとその画像が消える。画像の分解能も良く植物体内の画像も、さらに時間の経過にそった測定もできるため、非常に有効であるといえるが、対象物の大きさなどが制限される場合もある。一方、物体が放射している赤外線の強さは温度が高いほど増加するので、その放射エネルギーを検知することで非接触的に温度が測定できることと、二次元での画像化することが可能な点で、植物の表面の温度のみの測定であるが赤外線サーモグラフィの使用は、植物の凍結機構、また凍結傷害の調査に有効である。ニホンナシの花器においても、

凍結時の温度変化（発熱現象），つまり平均1～3℃の温度の上昇が赤外線サーモグラフィの使用で明らかな色の変化として観察できた。これによると花器の凍結はがく片・花托周辺から始まっており，その後花器全体に拡がっていくことが確認された。凍結試験後の傷害の様子からも，最も弱いはずの胚珠，雌ずいよりも先に花托において傷害が発生する様子が明らかとなった。このことから花器の霜害は，各構成部位の低温耐性の差だけではなく，凍結開始部位とその後の氷晶の伝搬が重要な要因となることが示唆された（第35図）。すなわちニホンナシ‘幸水’では，凍結試験後の傷害の現れる様子と赤外線サーモグラフィから得られた熱画像の変遷から，氷晶はまずがく片・花托の表皮上またはその直下に形成され，その後胚珠を経由して雌ずいや花柄に伝搬していくものと考え

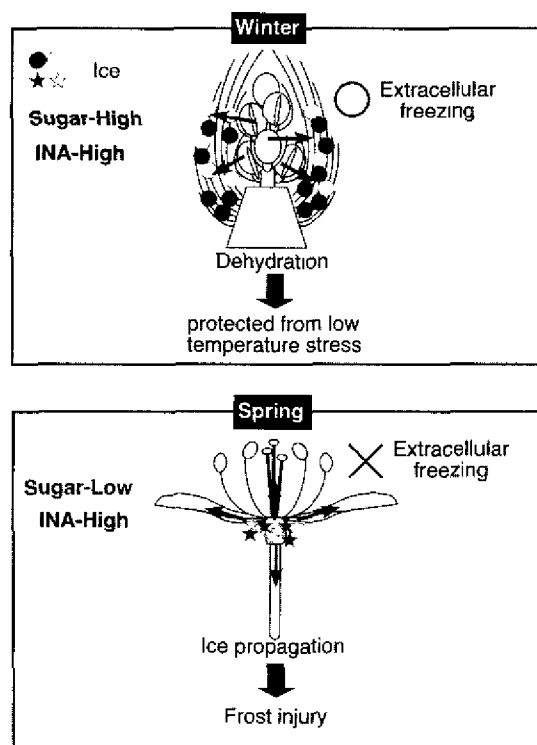


Fig. 35 Hypothetical principles of low temperature tolerance and frost injury in flower bud or flower of 'Kousui' Japanese pear.

えられた。つまり，低温に対する感受性の組織と氷晶を形成しやすい組織とは別であることが推察できた。

植物において，氷晶を形成する要因の一つは氷核活性細菌である。Wisniewskiら（1997）と Workmasterら（1999）は凍結試験の際に，凍結を誘導するために氷核活性細菌を使用している。またLindowら（1996）はセイヨウナシにおいて霜害や火傷病を制御するために *Pseudomonas fluorescens* を使用している。彼らによれば *Pseudomonas fluorescens* strain A506 を処理することにより氷核活性細菌の数が無処理のものに比べ減り，霜害による被害を40%にまで抑えることができた。また他の系統の細菌も火傷病を制御するために，商業的に使用できるかどうか試験が進められている（Mercier・Lindow, 1996）。氷核活性細菌は植物の組織が過冷却することを制限し，また花において凍結のパターンにも影響する。今回の試験において，凍結を誘導するために氷核活性細菌を使用しなかったが，最初に凍結が確認できたがく片や花托は，高い氷核活性を持つと考えられた。

これらのことから，凍結機構とその凍結の制御機構は低温耐性にとり重要であることが考えられたので，それぞれの器官の組織における氷晶の形成しやすさ，つまり氷核活性を測定した。氷核活性細菌が霜害に関わっていることは以前から報告されていたが（Schnell・Vali, 1972），一方，最近になって低温耐性のある植物は，細胞壁や細胞内に氷核形成物質を持っている可能性が示唆されてきた（Grossら，1988；Ishikawaら，1992；Brushら，1994；Ishikawaら，2000）。ニホンナシ‘幸水’の開花期の花器における氷核活性は，花托，がく片，花柄で高く，雄ずい，雌ずいは非常に低かった。氷核活性が比較的高かったがく片・花托はIRカメラでの観察で示したように，凍結試験中，花器の中で最初に凍結が始まり，最初に傷害の兆候があらわれる部位である。さらに，細菌による影響を除外するためオートクレーブ後の氷核活性も測定したところ，雄ずいを除くすべての器官において氷核活性はオートクレーブ後低

下したが、がく片、花托、花柄は雄ずいや雌ずい  
に比べ氷核活性が高かった。オートクレーブにより  
植物細胞や組織が破壊されるため、植物由来の  
氷核活性物質の変成も予想されたが、オートクレー  
ブ前後ともほぼ同じ傾向であった。よって氷核  
活性細菌による影響だけでなく、ニホンナシの花  
器の組織由来の氷核活性にも差があることが示さ  
れた。このことからニホンナシの花器においても、  
各器官特有の氷核活性の強さがその凍結様式に大  
きく関与していることが示された。

また、自然界には反対に氷の成長を制御する物  
質も存在し、このような活性を持つ物質を凍結阻  
害物質と呼ぶ。凍結阻害物質の存在は、厳寒地で  
生息する海の生物の生存と深く関わっており、南  
極の魚の血清中には凍結阻害タンパク質が含まれ  
ている。凍結阻害タンパク質は、凍結阻害糖タン  
パク質と凍結阻害タンパク質の2種類に分類さ  
れ、植物においても低温耐性の高まりとともに、  
糖タンパク質が増加することが報告されている  
(勾坂, 1974)。また凍結阻害タンパク質も植物に  
存在することが確認されている (Griffithら,  
1992)。これらの凍結阻害物質は凍結を阻害す  
ることよりも、成長する氷晶の形や大きさを制御す  
る働きをすると考えられている (荒田, 1998)。  
凍結阻害物質がどのような機構によって氷晶の成  
長を制御しているかについては不明な点も多い  
が、植物の凍結様式にも関与している可能性があ  
る。

このように、開花期の花器における低温耐性や  
凍結様式に、植物由来の氷核活性が大きく関わっ  
ていることが示され、冬季の花芽における低温耐  
性にも氷核活性が重要な要因である可能性が考え  
られた。多く植物で花芽の小花の細胞は細胞外凍  
結する能力に乏しく、細胞内凍結を起こしやすい。  
しかし、凍結している周囲の組織からの氷晶の伝  
搬を防ぎ、器官ぐるみで器官内の水分を外部に氷  
晶として析出させ、凍結脱水を促進させる器官外  
凍結をしている (酒井, 1982)。示差熱分析の結果  
から、ニホンナシの花芽は器官外凍結を行わない  
と考えられてきた (Rajashekarら, 1982)。し  
かしKangら (1998) はニホンナシでも、花芽は

器官外凍結を行い、小花を過冷却させ低温障害を  
回避していると報告している。花芽の氷核活性を  
測定したところ、外部鱗片、内部鱗片および新梢  
における氷核活性は、小花および包葉に比べ高く、  
ほぼ一定の値であった。それに対し、小花や包葉  
においてハードニングに伴い氷核活性の上昇がみ  
られたことから、氷核活性が花芽の低温耐性に大  
きく関与し、厳冬期の花芽は氷核活性の上昇とと  
もに、鱗片の間や包葉の周囲に氷晶を作りやすく  
し、重要な器官である小花を低温障害から回避さ  
せるために、脱水を促している可能性が示された。  
しかし、ニホンナシの花芽が器官外凍結すること  
により小花を過冷却させているのか、または小花  
の細胞が細胞外凍結を起こしているのかは判定で  
きなかった。また同時に小花においては、細胞内  
に主として糖などの適合溶質を蓄積し、細胞外凍  
結時のストレスに対する耐性も上昇させ、傷害を  
防止していると考えられた (第35図)。

一方、デハードニング期には測定したいずれの  
部位も、厳冬期とはほぼ同程度の高い氷核活性を保  
っていた。つまり春になって気温が上昇し、氷晶  
が形成される機会は減ったものの、組織が氷晶を  
形成する力はそのまま維持されていることが示さ  
れた。前述したようにデハードニングにともない、  
水分含量が増加し、花芽において細胞内の浸透圧  
を増加させ、過冷却を促している主要な溶質と考  
えられたソルビトールなどの糖は、急激に減少し  
ている。そのため、低温時の凍結やそれに伴う脱  
水により、細胞膜が損傷を受けやすくなっている  
と考えられた (第34図)。これらのことからデハ  
ードニングにおける低温傷害は、厳冬期には保持  
していた、氷晶の形成しやすさとそれに対する防  
御機構のうち、防御機構のみを失ったために起こ  
ると考えられた。ニホンナシの花芽においては、  
厳冬期にはうまく機能していた両者のバランス  
が、気温が上がり春になると崩れるため、春先の  
不意の低温による傷害を受けやすくなり、晩霜害  
が発生するのであろう (第35図)。

一方、黒田ら (1991) が報告しているように、  
低温耐性は過酸化代謝が密接に関係し、さらに  
ニホンナシの花器の生体膜脂質中の不飽和度が低



下するにつれて、低温耐性が低下するとのLiaoら(1997)の報告を考慮に入れると、これらの防御機構も影響して、低温耐性が低下するのであろう。

以上のように、ニホンナシ‘幸水’花器の凍結様式に各器官の水核活性は、大きく関与していることが示唆されたが、低温耐性、水核活性の間の関係は必ずしも直接的ではないことが明らかとなった。

凍霜害発生の機構の一端が解明されるので、次に晩霜害回避の方法として植物成長調節物質であるPDJ処理による効果を検討した。PDJ処理は褐変の程度、電解質漏出率の両方の結果から、開花期の花器における低温耐性を高める傾向が認められた。花器の部位ごとに測定したが、全体的にどの部位においても低温傷害を緩和する傾向であったが、花器のステージにより効果が高い部位が一定でなかった。したがって同一の器官であっても生育ステージの違いにより、PDJに対する感受性が異なることが考えられた。そして花芽のハードニング・デハードニングにおいて、主要な溶質であった糖が、PDJ処理により増加したことから、PDJ処理は花器における溶質集積を促進することが分かった。したがって、開花期の花器においてのPDJ処理による低温耐性の賦与は、糖が大きく関与していることが示唆された。

アミノ酸ではプロリンがPDJ処理により増加した。ニホンナシの花芽におけるハードニングにはプロリンはあまり関係していないようであったが、花器においてはプロリンが他の植物での報告(Withers・King, 1979)と同様に凍結防御物質として働いた可能性もある。Szalaiら(1997)は、トウモロコシの幼苗期において低温処理により全アミノ酸量が増加したと報告している。本実験においてはPDJ処理でも全体のアミノ酸量は変わらなかった。したがって、低温処理とPDJ処理においては異なる機構が働いている可能性が考えられた。

以上のように、ニホンナシの花器においてPDJ処理は溶質の蓄積を促進させ、そのことにより低温による被害を回避できることを明らかにした(第36図)。また内生ABA含量を測定したところ、

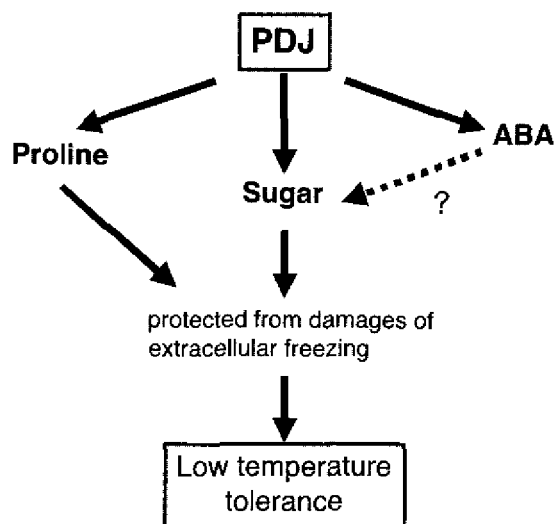


Fig. 36. A possible pathway of PDJ application in 'Kousui' Japanese pear.

被害の甚だしかった花托・子房部よりも、比較的軽かった花柄・果梗部の方がABA含量は高く、ABAの含量と低温耐性の強さとの関与が示唆された。このことは先に示した季節変化にともなうデハードニング過程における低温耐性とABAとの関係とは異なり、Tanino(1990)がチャヒキの細胞で、またLangら(1994)がアラビドプシスで報告している結果と同様に、ABA含量が低温耐性の強さと関与することを示している。したがって植物の部位やその生育ステージおよび季節により、ABAの作用機構や作用箇所、またそれに対する応答が異なっており、低温耐性とABAとの関係も全体でみるよりも、その器官ごと、またステージごとに詳細に調査する必要がある。ABAと低温耐性との間に相関が見られる報告の多くが、キュウリ(Capell・Dorffing, 1989)、コムギ(Chen・Gusta, 1983)、アラビドプシス(Lang, 1994)などの幼苗期や培養細胞での実験であり、ニホンナシのように永年性木本植物の場合、開花期の花器は上記の例と同様に活発な生育をしている器官であるため、冬季の花芽とは異なり、ABAと低温耐性との間に直接的な関係がみられたのかもしれない。しかし、部位間で比較

すると同一器官同士の比較では、傷害が少ない区ほどABA含量が高かったが、花柄に比べABA含量の高い花托では、花柄よりも傷害を受けやすかった。このことから、花器の部位ごとにABAに対する感受性やその作用機構も異なることが示唆された。

ABAは、果実を含む様々なシンク器官への糖の蓄積を促進することが知られており（近藤，1994；小橋，1998；Kobashiら，2000），またニホンナシと同じバラ科のモモ果実においては、ソルビトール、フルクトース、グルコースの取り込みがABAによって、能動輸送・拡散の両方の経路で促進されていることが報告されている（小橋，2000）。したがって本実験においても、ニホンナシの花器においての糖含量の増加は、ABAによる影響である可能性が考えられた。さらにPDJとおなじジャスモン酸関連物質である、メチルジャスモン酸処理したズッキーニ果実の外果皮では、対照区果実よりも高いABA含量であった（Wang・Buta，1994）。同様にPDJ処理により内生のABA含量が増加することは、カキ（Gemmaら，1998）、ブドウ（東川，1998）で報告されている。したがってPDJ処理は、花器において内生のABA含量を高める傾向もあったので、溶質特に糖の蓄積促進のPDJ処理の効果はABAを介して行われる可能性も高いと考えられた（第36図）。

しかし種の違い、生育ステージの違いがジャスモン酸と低温耐性との関係にどのように影響するかは今後の課題である。そしてPDJ処理により内生のABA含量が増加したが、PDJ処理効果がABAを介した低温耐性の賦与効果なのか、PDJの他の経路による直接的な効果なのかは、今後確認する必要がある。

ジャスモン酸は膜脂質の構成脂肪酸であるリノレン酸を合成の出発物質としている（Creelman・Mullet，1997；Sembdner・Parthier，1993；吉原，1990）ので、低温下において生体膜の安定に関与する可能性も考えられる。低温耐性には生体膜の相転移温度が重要であり、膜脂質中の脂肪酸の不飽和度により規定されているといわれている。不飽和度が高いと、より低い温度まで

膜の流動性が保持され生体膜が機能するとされている。Liaoら（1997）はニホンナシの花器における生体膜脂質中の不飽和度が低下するにつれて、低温耐性が低下すると報告しており、リノレン酸を含む脂肪酸の不飽和度が低温耐性に大きく影響すると思われる。したがってPDJ処理が、植物中のジャスモン酸生成、および膜脂質中のリノレン酸の動態に影響した可能性も考えられた。そのためPDJ処理が、内生ジャスモン酸およびリノレン酸を含む脂肪酸へ与える影響を調査することが、今後必要である。ニホンナシの枝において、ハードニング処理に代わりにPDJ処理で得られた低温耐性は、露地で生育した場合、すなわち低温順化の効果には至っていないので、低温耐性獲得におけるジャスモン酸の関与については、さらなる研究が必要とされる。

実験に用いたPDJは植物体内でジャスモン酸と同様の生理作用を持ち、化学的に安定であるため圃場での処理に適しており、そして多くの場合ABAよりも低濃度でより高い効果を示すと考えられている（竹内・禿，1997）。しかし、今回の結果からは最適処理濃度や散布時期の明確な傾向は確認できなかった。実際の農家の現場では、晩霜の予報がされるのが発生約12時間前のため、実用的な面を考慮に入れるとより短時間における効果の有無を調査する必要もある。

以上のように本研究は、第一にハードニング・デハードニング過程での低温耐性の獲得・消失は、花芽中の溶質、特にソルビトールやスクロースの蓄積・消長と平行して起こっており、また低温耐性の獲得にはABAが関与していることも示された。さらに氷核活性が花芽の低温耐性に大きく関与していることが示され、デハードニング過程での凍結防御機構と凍結促進機構のバランスの崩れが晩霜害発生の要因であることが明らかにされた。

第二に、ニホンナシ‘幸水’花器では、がく片および花托付近から氷晶の形成が起こっていることが確認でき、傷害発生は低温耐性の差のみではなく、凍結開始部位とその伝搬が重要な要因となることが示唆され、低温に対し感受性の組織と、

氷晶を形成しやすい組織とは別であることを明らかにした。第三に、PDJ処理は開花期の花器における低温耐性を高める傾向が認められ、またPDJ処理によりプロリンおよび様々な糖の蓄積が促進されていることも確認された。さらにPDJ処理により低温耐性が高まり、内生のABAの含量も増加することから、この低温耐性の賦与効果が、ABAを介したものである可能性が示され、ニホンナシの晩霜害対策に貢献し得るものであると考えられた。

## 摘 要

ニホンナシ栽培における凍霜害発生を防止するために、‘幸水’を用いて凍霜害発生機構の解明、さらには植物成長調節物質PDJの利用による晩霜害防止法の確立を目標に、ハードニング・デハードニング過程におけるニホンナシの生理的変化や、開花期の花器における凍結傷害発生様式およびPDJの低温耐性に及ぼす影響を検討・調査した。

1. ハードニング・デハードニング過程での耐凍性の獲得・消失は、花芽中の糖、特にソルビトールやスクロースの蓄積・消長と平行して起こっており、ニホンナシ‘幸水’花芽においても、細胞内に多量の糖を蓄積することによって浸透濃度を増加させ、モル氷点降下により一定温度での凍結脱水の程度を緩和させていることが示唆された。またハードニングにおいて耐凍性の高まりとともに、小花での内生ABA含量は増加していったことから、耐凍性の獲得にはABAが関与していることが示されたが、デハードニングにおいて、そのようなABAの含量との相関はみられなかったため、この時期には植物体内の水分状態に関与することにより低温耐性に間接的に関係しているのではないかと示唆された。

2. 凍結機構とその凍結の制御機構は、低温耐性の研究にとり重要であることから、ハードニング・デハードニング過程での花芽の氷核活性を測定したところ、耐凍性の獲得とともに小花において氷核活性が上昇していった。このことから、氷

核活性が花芽の耐凍性の獲得に大きく関与していることが示唆された。しかし、デハードニング開始後も花芽において高い氷核活性が維持される一方、水分含量の増加、溶質の減少が平行して起こった。その結果、厳冬期にはうまく機能していた、低温耐性に関与する凍結防御機構と凍結促進機構の両者のバランスが崩れたため、春先の不意の低温による傷害を受けやすくなり晩霜害が発生すると考えられた。

3. 赤外線サーモグラフィにより開花期における花器の凍結過程を観察したところ、かく片および花托付近から氷晶の形成が起こっていることが確認できた。そのため、晩霜害でもっとも被害に遭いやすい胚珠や雌ずいの傷害は、隣接組織からの氷晶の伝搬によるものであると考えられた。したがって、花器の霜害はそれぞれの組織の低温耐性だけでなく、花器全体の凍結様式が大きく関わっていることが確かめられた。また、この氷晶の形成および器官の凍結様式は植物組織が保有する氷核活性により制御されていることが確認された。

4. PDJ処理による晩霜害回避の可能性を調査するため、PDJ処理が花器および幼果の低温耐性および内生成分に与える影響を調査した。PDJ処理は開花期の花器における低温耐性を高める傾向が認められ、またPDJ処理によりプロリンおよび糖の蓄積が促進されていることも確認できた。さらにPDJ処理により低温耐性が高まり内生のABAの含量も増加したことから、この低温耐性の賦与効果がABAを介したものである可能性が示された。以上のことからPDJ処理がニホンナシの晩霜害回避の手段として有効であることが示された。

これらの研究は、ニホンナシのみならず降霜地帯で栽培される果樹の凍霜害防止対策への基礎資料として有用され、ひいては霜害発生予測技術と相まって効率的な防止法の確立に十分に貢献できるものとする。

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたり、数々のご指導を頂くと共に、御校閲の労を賜りました筑波大学農林学系、弦間 洋教授、同坂井直樹教授、同西村繁夫教授、農林工学系、小池正之教授に心より感謝いたします。また本研究を進めるにあたり数々の御助言および御指導をいただいた農林学系、菅谷純子講師に心より感謝いたします。また、農林技術センター内圃場および実験室にて数々の管理をしていただいた農林技術センター、酒井一雄技官、西田清作技官、横山和人技官、今野 均技官、比企 弘技官、山本倫成技官、吉田勝弘技官、農林学系、大島 泉技官、山崎順子技官に心より感謝いたします。

また、元筑波大学農林学系、岩堀修一教授、同福島正幸助教授には、数々のご指導をいただき、心から感謝します。赤外線サーモグラフィでの測定についての御指導、御協力を頂いた筑波大学農林工学系、瀧川具弘助教授、同長谷川英夫助手、また低温耐性ならびに氷核活性の測定についてのご指導、ご協力を頂いた農業生物資源研究所、石川雅也博士、Saskatchewan大学、Karen Tanino博士に心より感謝いたします

さらにABA、PDJを提供していただいたバル企画、禿 泰雄博士、進路の選択にあたり数々のご相談をしていただいた、元筑波大学農林学系高柳謙治教授に心から感謝します。

また研究を進めるにあたり多くの御助言および御協力をいただいた筑波大学農林学系、江面 浩助教授、同半田 高講師、同福田直也講師、野菜茶業研究所、鈴木 徹博士、鳥根大学農学部付属農場、山岸主門助手、に心より感謝いたします。筑波大学果樹研究室の学生一同には、研究を続けていく上で多くの御協力を頂きました。心よりお礼申し上げます。

最後に、小橋謙史博士には特に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 荒田洋治 1998 耐寒性と乾燥適応 PNEモノグラフ 水の書. p.153-172. 共立出版. 東京.
- Ashworth, E. N., J. A. Anderson and G. A. Davis. 1985. Properties of ice nuclei associated with peach trees. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 : 287-291.
- Ashworth, E. N., J. A. Anderson, G. A. Davis and G. W. Lightner. 1985. Ice formation in *Prunus persica* under field condition. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 : 322-324.
- Ashworth, E. N., G. A. Davis and M. E. Wisniewski. 1989. The formation and distribution of ice within dormant and deacclimated peach flower buds. Plant Cell and Environ. 12 : 521-528.
- Ashworth, E. N. 1992. Formation and spread of ice in plant tissues. Hort. Rev. 13 : 215-255.
- Bohnert, H. J., D. E. Nelson, and R. G. Jensen. 1995. Adaptations to environmental stresses. The Plant Cell 7 : 1099-1111.
- Boorse, G. C., T. L. Bosma, A. C. Meyer, F. W. Ewers and S. D. Davis. 1998. Comparative methods of estimating freezing temperatures and freezing injury in leaves of chaparral shrubs. J. Plant Sci. 159 : 513-521.
- Brush, B. A., M. Griffith, and A. Mlynarz. 1994. Characterization and quantification of intrinsic ice nucleators in winter rye (*Secale cereale*) leaves. Plant Physiol. 104 : 725-735.
- Capell, B. and K. Dorffling. 1989. Low temperature-induced changed pf abscisic acid contents in barley and cucumber leaves in relation to their water status. J. Plant Physiol. 135 : 571 - 575.
- Carter, J., R. Brennan and M. Wisniewski. 1999. Low-temperature tolerancr of blackcurrant flowers. HortScience 34 : 855-859.
- Carter, J., R. Brennan and M. Wisniewski. 2001.

- Patterns of ice formation and movement in blackcurrant. *HortScience* 36 : 1027-1032.
- Ceccardi, T. L., R. L. Heath and I. P. Ting. 1995. Low-temperature exotherm measurement using infrared thermography. *Hort. Sci.* 30 : 140-142.
- Chen H-H, P. Gavinlertnatana and P. H. Li. 1979. Cold acclimation of stem-cultured plants and leaf callus of *Solanum* species. *Bot Gaz.* 140 : 142-147.
- Chen H-H, P. H. Li, and M. L. Brenner. 1983. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol* 71 : 362-365.
- Chen T.H.H. and L.V. Gusta. 1983. Absciscic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. *Physiol. Plant.* 73 : 71-75.
- Creelman, R. A. and J. E. Mullet. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 p. 355-381.
- Dathe, W., H. Ronsch, A. Preiss, W. Schade, G. Sembdner and K. Schreiber. 1981. Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasimonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* 153 : 530-535.
- Dexter, S. T., W. E. Tottingham and L. F. Graber. 1932. Investigations of hardiness plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiol.* 2 : 63-78.
- Ding, C. K., C. Y. Wang, K. C. Gross and D. L. Smith. 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science* 161 : 1153-1159.
- Ding, C. K., C. Y. Wang, K. C. Gross and D. L. Smith. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214 : 895-901.
- Durner, E and T. Gianfagna. 1991. Peach pistill carbohydrate and moisture contents and growth during controlled deacclimation following ethephon application. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 : 507-511.
- 柴花 茂・酒井 明. 1973. トドマツ苗木の耐凍性変動に及ぼす温度の影響. *日林誌.* 54 : 412-417.
- Flinn, C. L. and E. N. Ashwoth. 1995. The relationship between carbohydrates and flower bud hardiness among three *Forsythia* Taxa. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120 : 607-613.
- Fujisawa, H., M. Koshiyama, H. Seto, S. Yoshida and Y. Kamuro. 1997. Effect of jasmonic acid compound on fruit setting, fruit growth, ripening and cold-resistance. *Acta Hortic.* 463 : 261-266.
- Fuller, M. P. and M. Wisniewski. 1998. The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *J. Therm. Biol.* 23 : 81-89.
- Gemma, H., K. Togawa and Y. Sekozawa. 1998. Possibility of n-propyl dihydrojasmonate application for thinning fruit, defoliating and promoting the fruit maturation as a cultural technique. *XXV IHC Abstract* : 126.
- Gemma H. 2000. Possibility of n-propyl dihydrojasmonate application for thinning fruit, defoliating and promoting the fruit maturation as a cultural technique. *Acta Hortic.* 516 : 57-66.
- Gonzalez-Aguilar, G. A., J. Fortiz, R. Cruz, R. Baez and C. Y. Wang. 2000. Methyl jasmonate reduces chilling injury and maintains postharvest quality of mango fruit. *J. Agric. Food. Chem.* 48 : 515 - 519.
- Griffith M., P. Ala, D.S.C. Yang, W.C. Hon and B. A. Moffatt. 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye

- leaves. *Plant Physiol.* 100 : 593-596.
- Gross, D.C., E.L. Proebsting Jr. and M.C. Zimmerman, H. 1988. Development, distribution, and characteristics of intrinsic, nonbacterial ice nuclei in *Prunus* wood. *Plant Physiol.* 88 : 915-922.
- Guy, C. L., D. Haskell, L. Neven, P. Klein and C. Smeiser. 1992. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta* 188 : 265-270.
- 堀本宗清・荒木 斉. 1999. クリの冬・春季の枝水分及び木部圧の経時的変化と凍害の関係. *農業気象*. 55 : 25-32.
- 猪俣雄司・村瀬昭治・及川 悟・篠川 雄・鈴木邦彦. 1992. ニホンナシの晩霜害発生後における花器へのジベレリン処理の効果. *果樹試報*・23 : 123-136・
- 猪俣雄司・八重垣英明・鈴木邦彦. 1993. ジベレリン処理によるニホンナシの晩霜害軽減対策. *農業気象*. 49 : 105-109.
- Irving, R. M. and F. O. Lanpher. 1967. Environmental control of cold hardiness in woody plants. *Plant Physiol.* 42 : 1191-1196.
- Ishikawa, M. and A. Sakai. 1981. Freezing avoidance mechanisms by supercooling in some *Rhododendron* flower buds with reference to water relations. *Plant Cell Physiol.* 22 : 953-967.
- Ishikawa, M. and A. Sakai. 1985. Seasonal changes in plasma membranes and mitochondria isolated from Jerusalem artichoke tubers. Possible relationship to cold hardiness. *Plant Cell Physiol.* 26 : 1331 - 1344.
- Ishikawa, M., A. J. Robertson and L. V. Gusta. 1990. Effect of temperature, light nutrients and dehardening on abscisic acid induced cold hardiness in *Bromus inermis* Leyss suspension cultured cells. *Plant cell Physiol.* 31 : 51-59.
- Ishikawa, M. and S. Miyazaki. 1992. Ice nucleating activity in various parts of wintering *Rhododendron* flower buds and freezing behavior of floret tissues: their relevance to extraorgan freezing. *Swed. Univ. of Agric. Sci. Ecol. & Environ. Res. Rep.* 53 : 27.
- Ishikawa, M., A. J. Robertson and L. V. Gusta. 1995. Comparison of viability tests for assessing cross-adaptation to freezing, heat and salt stresses induced by abscisic acid in bromgrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells. *Plant Science* 107 : 83-93.
- Ishikawa, M., W.S. Price, H. Ide and Y. Arata. 1997. Visualization of freezing behaviours in leaf and flower buds of full-moon maple by nuclear magnetic resonance microscopy. *Plant Physiol.* 115 : 1515-1524.
- Ishikawa, M., H. Ide, W.S. Price, Y. Arata and T. Kitashima. 2000. Freezing behaviors in plant tissues as visualized by NMR microscopy and their regulatory mechanisms. In : F. Engelmann, H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. p22-35. IPGRI, Rome.
- 猪崎政敏. 1985. 気象災害 p. 211-218. 猪崎政敏編著. ニホンナシ生産の実際. 博友社. 東京.
- Kaku, S., M. Iwaya and M. Kunishige. 1980. Supercooling ability of *Rhododendron* flower buds in relation to cooling rate and cold hardiness. *Plant Cell Physiol.* 21 : 1205-1216.
- 金田美奈子・原 慶明・鈴木 隆・白石卓夫. 2001. 甘果オウトウの花芽雌ずいにおける低温での障害発生の温度条件. *園学雑*. 70 : 516-518.
- Kang, S.K., H. Motosugi, K. Yonemori, A. Sugiura. 1998. Freezing injury persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) and four other *Diospyros* species during deacclimation in

- the spring as related to bud development. *Scientia Hort.* 77 : 33-43.
- Kang, S. K., H. Motosugi, K. Yonemori, and A. Sugiura. 1998. Supercooling characteristics of some deciduous fruit trees as related to water movement within the bud. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 73 : 165-172.
- 関東農政局茨城統計事務所編. 1990. 茨城におけるニホンナシの糖霜害. pp. 36. 農林水産統計協会. 茨城.
- 小橋謙史 1999. モモ果実の生長・成熟, 特に糖の蓄積に及ぼすアブシジン酸の影響. 筑波大学学位論文 (博士).
- Kobashi, K., H. Gemma and S. Iwahori. 2000. Absciscic acid content and sugar metabolism of peaches grown under water stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125 : 425-428.
- 小橋謙史 2000. 水ストレス, アブシジン酸 (ABA) とモモ果実の糖集積. 農および園. 75 : 487-495.
- 小林 章 1985. 晩霜害 p. 147-157. 果樹風土論. 養賢堂. 東京.
- 近藤矩朗 1994. アブシジン酸. 生理作用 p. 78-117. 高橋伸孝・増田芳雄共編 植物ホルモンハンドブック (下). 培風館. 東京.
- 小中原 実 1988. カンキツの気象災害-発生のしくみと防ぎ型. 農文協. 東京. pp. 335.
- Kozukue, N., E. Kozukue, T. Hirose and S. Mizuno. 1984. Accumulation of alanine in chilling-sensitive crops. *HortScience* 19 : 498-501.
- 黒田治之・勾坂勝之助・千葉和彦. 1991. 厳寒期におけるリンゴ属植物の耐凍性と過酸化物代謝. 園学雑. 60 : 719-728.
- Kushad, M. M. and G. Yelenovsky. 1987. Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of *Citrus*. *Plant Physiol.* 84 : 692-695.
- Lang, V., E. Mantyla, B. Welin, B. Sundberg and E. T. Palva. 1994. Alternations in water status, endogenous absciscic acid content, and expression of rab 18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104 : 1341-1349.
- Larcher, W. 1999. 自然環境のストレス p. 241-301. 植物生態生理学 (佐伯敏郎監訳). シュプリンガー・フェアラーク東京. 東京.
- 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 in 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 in Biol.* 35 : 21-28.
- Lim, C. C. and R. Arora. 1998. Comparing Gomperts and Richards functions to estimate freezing injury in *Rhododendron* using electrolyte leakage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123 : 246-252.
- Lindow, S.E., D. C. Arny and C. D. Uppet. 1982. Bacterial ice nucleation : A factor in frost injury to plants. *Plant Physiol.* 70 : 1084-1089.
- Lindow, S.E., G. McGourty and R. Elkins. 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology* 86 : 841-848.
- Ludewig, M., K. Dorffing and H. Scifert. 1988. Absciscic acid and water transport in sunflowers. *Planta* 175 : 325-333.
- Maki, L. R., E. L. Galyan, M. Chang-chien and D. R. Caldwell. 1974. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiol.* 28 : 456-459.
- Mantyla, E., V. Lang and E. Tapio Palva. 1995. Role of absciscic acid in drought-induced

- freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 107 : 141 - 148.
- Mercier, J. and S. E. Lindow. 1996. A method involving ice nucleation for the identification of microorganisms antagonistic to *Erwinia amylovora* on pear flowers. Phytopathology 86 : 940-945.
- 三上浩司・村田紀夫. 1999. 温度変化への応答と適応の分子機構. p. 36-47. 渡邊 昭・篠崎 一雄・寺島一郎監修. 植物の環境応答-生存戦略とその分子機構. 秀潤社. 東京.
- 宮下晃一・米谷俊彦. 1999. 低温環境下で生じる熱映像温度計の測定誤差と温度補正に関する考察. 農業気象 55 : 33-40.
- 中村敏英・高部鉄子. 1999. 耐塩性と適合溶質の機能. 蛋白質 核酸 酵素 44 : 2214-2220.
- Nesbitt M.L., N.R. McDaniel, R.C. Ebel, W.A. Dozier and D.G. Himelricks 2000. Performance of satsuma mandarin protected from freezing temperatures by microsprinkler irrigation. HortScience 35 : 856-859.
- 小沢 行雄・本田 勲夫. 1955. 梨の凍霜害に関する一実験. 農業気象 11 : 35-36.
- Pearce, R. S. and J. H. M. Willison. 1985. Wheat tissues freeze-etched during exposure to extracellular freezing: distribution of ice. Planta 163 : 295-303.
- Pellet, N. E. and D. A. Heleba. 1998. Comparing callus growth with discoloration and electric conductivity as measure of stem injury after freezing woody plants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123 : 826-831.
- Price, W. S., H. Ide, M. Ishikawa and Y. Arata. 1997a. Intensity changes in 1H-NMR micro-images of plant materials exposed to subfreezing temperatures. Bioimages 5 : 91-99.
- Price, W. S., H. Ide, Y. Arata and M. Ishikawa. 1997b. Visualization of freezing behaviours in flower buds tissues of cold-hardy *Rhododendron japonicum* by nuclear magnetic resonance micro-imaging. Aust. J. Plant Physiol. 24 : 599-605.
- Quamme, H. A., C. Stushnoff and C.J. Weiser. 1972. The relationship of exotherms to cold injury in apple stem tissues. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97 : 608-613.
- Quamme, H. A. 1978. Mechanism of supercooling in overwintering peach flower buds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103 : 57-61.
- Quamme, H. A., W. A. Su and L. J. Veto. 1995. Anatomical features facilitating supercooling of the flower within the dormant peach flower bud. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120 : 814-822.
- Rajashekar, C., M. N. Westwood and M. J. Burke. 1982. Deep supercooling and cold hardiness in genus *Pyrus*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107 : 968-972.
- Rodrigo, J. 2000. Spring frosts in deciduous fruit tree-morphological damage and flower hardiness. Scientia Hort. 85 : 155-173.
- 勾坂勝之助. 1974. 低温下の植物代謝. 科学と生物 12 : 15-29.
- Sagisaka, S. 1974. Effect of low temperature on amino acid metabolism in wintering poplar. Arginine-glutamine relationships. Plant Physiol. 53 : 319-322.
- 佐治 光. 1999. 大気汚染ガス傷害・耐性の分子機構. 蛋白質 核酸 酵素 44 : 2253-2259.
- Sakai, A. and S. Yoshida. 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. Cryobiology 5 : 160-174.
- 酒井 昭. 1982. 植物の耐凍性と寒冷適応. pp. 469. 学術出版センター. 東京.
- 坂野勝啓. 1981. 各種アミノ酸合成の概略. アミノ酸合成の調節. p. 191-205. 旭 正編 植物生理学3 代謝. 朝倉書店. 東京.
- Saniewski, M., H. Urbanek and J. Czapski. 1987a.



- Effect of methyle jasmonate on ethylene production, chlorophyll degradation, and polygalacturonase activity in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 127 : 177-181.
- Saniewski, M., J. Nowacki and J. Czapski. 1987b. The effect of methyle jasmonate on ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in tomatoes. *J. Plant Physiol.* 129 : 175-180.
- Sasaki, H., K. Ichimura, K. Okada and M. Oda. 1998. Freezing tolerance and soluble sugar contents affected by water stress during cold-acclimation and de-acclimation in cabbage seedlings. *Scientia Hort.* 76 : 161-169.
- Schnell, R. C. and G. Vali. 1972. Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation. *Nature* 236 : 163-165.
- 瀬古澤由彦・弦間 洋. 2003. 果樹の凍霜害防止対策の現状. 植物の生長調節 38 : 240-248.
- Sekozawa, Y., S. Sugaya and H. Gemma. 2004. Observations of ice nucleation and propagation in flowers of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) using infrared video thermography. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73 : 1-6.
- Sekozawa, Y., S. Sugaya, H. Gemma and S. Iwahori. 2003. Cold tolerance in 'Kousui' Japanese pear and possibility for avoiding frost injury by treatment with *n*-propyl dihydrojasmonate. *HortScience* 38 : 288-292.
- Sekozawa, Y., M. Ishikawa, S. Sugaya, H. Gemma and S. Iwahori. 2002. Seasonal Changes in the ice nucleation activity of various tissues in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) in relation to their freezing behavior and frost injury. *Acta Horticulturae* 587: 543-547.
- Sembdner, G. and B. Parthier. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonate. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 p. 569-589.
- Seo, S., H. Sano and Y. Ohashi. 1997. Jasmonic acid in wound signal transduction pathways. *Physiol. Plant.* 101 : 740-745.
- Seo, S., H. Sano and Y. Ohashi. 1999. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell* 11 : 289-298.
- Siminovitch, D., H. Therrien, G. Gfeller and B. Rheume. 1964. The quantitative estimation of frost injury and resistance in black locust, alfalfa and wheat tissues by determination of amino acids and other ninhydrin-reacting substances released after thawing. *Can. J. Bot.* 42 : 637-649.
- Sperry, J. S., N. M. Holbrook and M. H. Zimmermann. 1987. Spring filling of xylem vessels in wild grape-vine. *Plant Physiol.* 83 : 414-417.
- Steponkus, P. L., and F. O. Lanphear. 1967. Refinement of the triphenyle tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42 : 1423-1426.
- Szalai, G., T. Janda, T. Bartok and E. Paldi. 1997. Role of light in change in free amino acid and polyamine content at chilling temperature in maize (*Zea mays*). *Physiol. Plant.* 101 : 434-438.
- Takahashi, K., K. Fujino, Y. Kikuta and Y. Koda. 1994. Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Science* 100 : 3-8.
- 竹内安智・禿 泰雄. 1997. ブラシノステロイド及びジャスモン酸の生理作用と実用化研究の現状. 植物の化学調節 32 : 74-86.
- 高山 成・早川誠而・川村宏明. 1999. 霜害発生予察のための50mメッシュ地形情報を用いた局地的冷却現象の解析. 農業気象 55 : 235-246.
- 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.

- Tanino, K., C. J. Weiser, L. H. Fuchigami and T. H. H. Chen. 1990. Water content during abscisic acid induced freezing tolerance in bromegrass cells. *Plant Physiol.* 93 : 460-464.
- 帯刀有紀子. 1996. ニホンナシの芽の休眠生理と打破機構. 筑波大学学位論文 (修士)
- 東川公美. 1999. 植物老化促進物質ジャスモン酸のブドウ果実における成熟促進作用に関する研究. 筑波大学学位論文 (修士)
- Ueda, J., J. Kato, H. Yamane and N. Takahashi. 1981. Inhibitory effect of methyl jasmonate and its related compounds on kinetin induced retardation of oat leaf senescence. *Physiol. Plant.* 52 : 305-309.
- 上田純一. 1995. 植物の老化に関する生理活性物質の生物有機化学的研究. 植物の化学調節 30 : 1-4.
- Uthairutra, J and H. Gemma. 1991. Changes in abscisic acid content of peel and pulp of 'Jonagold' apples during pre- and post-harvest periods. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60 : 443-448.
- 内島立郎. 1986. 霜害・寒害 p.104-113. 長野敏英・清野 豁・佐瀬勘紀・塩沢 昌・石田朋靖・青木正敏・内島立郎・真木太一・大政謙次・岡田益己・蔵田憲次・皆川秀夫共著 農業気象・環境学. 朝倉書店. 東京
- Vonnegut, B. 1947. The nucleation of ice formation by silver iodide. *Appl. Phys.* 18 : 593-595.
- Wang, C. Y. and J. G. Buta. 1994. Methyl jasmonate reduces chilling injury in *cucurbita* pepo through its regulation of abscisic acid and polyamine levels. *Environ. Exp. Bot.* 34 : 427-432.
- Widholm, J. M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosahranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain. Technol.* 47 : 189-194.
- Wisniewski, M., S. E. Lindow and E. N. Ashworth. 1997. Observations of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. *Plant Physiol.* 113 : 327-334.
- Withers, L.A. and P. J. King. 1979. Proline : A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 64 : 675-678.
- Workmaster, B. A. A., J. P. Palta and M. Wisniewski. 1999. Ice nucleation and propagation in cranberry uprights and fruit using infrared video thermography. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124 : 619-625.
- 吉田静夫. 1999. 極限温度に対する生理応答. p. 24-35. 渡邊 昭・篠崎一雄・寺島一郎監修. 植物の環境応答—生存戦略とその分子機構—, 秀潤社. 東京.
- 吉原照彦. 1990. ジャスモン酸類の化学と活性. 植物細胞工学 2 : 523-531.

## 略語表

ABA	abscisic acid アブシシン酸
BR	bract苞葉
GLC	gas-liquid chromatography ガスクロマトグラフィ
DW	dry weight 乾物重
FID	flame ionization detector 水素炎イオン化検出器
FL	floret 小花
FW	fresh weight 生体重
HMD	Shexamethyl disilazane
HPL	High performance liquid chromatography 高速液体クロマトグラフィ
INA	ice nucleation activity 氷核活性
IS	inner scale 内部鱗片
JA	jasmonic acid ジャスモン酸
NMR	nuclear magnetic resonance 核磁気共鳴
OPA	ortho-phthalaldehyde オルトフタルアルデヒド
OS	outer scale 外部鱗片
PDJ	n-propyl dihydrojasmonate
PVPP	polyvinylpyrrolidone
RI	refractive index 示差屈折率
SD	standard error 標準偏差
SE	standard deviation 標準誤差
TMCS	trimethylchlorosilane
TCA	richloro acetic acid トリクロロ酢酸

## Study on the mechanisms of frost injury occurrence and the preventing techniques in Japanese pear

Yoshihiko Sekozawa

Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tennodai,  
Tsukuba 305-8572, Japan

### Summary

Most deciduous fruit trees require winter chilling temperatures to break dormancy of wintering flower buds. The buds sprout and bloom as the weather warms in the spring. These buds and/or flowers are prone to spring frost injury while they suffer no frost damage in mid winter. In fruit trees including the Japanese pear, frost injury can be particularly harmful. Fruit production is severely damaged during the periods of blooming and young fruit stage by spring frost.

The objective of this study was to examine the mechanism of freezing and spring frost injury and seasonal changes in the cold resistance of the Japanese pear, in addition, to determine if n-propyl dihydrojasmonate (PDJ), a synthetic Jasmonic acid (JA) derivative can be applicable for preventing spring frost damage to the Japanese pear.

1. Cold hardiness of flower buds changed in correspondence with changed carbohydrate levels in Japanese pear 'Kousui'. During cold acclimation, cold hardiness of flower buds increased as endogenous ABA levels were increasing from autumn to winter. It is suggested that intracellular freezing can be avoided by supercooling of flower bud or the solutions might protect the plasma membranes and proteins from freezing and dehydration in

the Japanese pear.

2. Seasonal changes in the ice nucleation activity of various tissues of Japanese pear 'Kousui' were investigated with the aim of studying the manner of freezing, which is an important mechanism for cold hardiness. The ice nucleating temperatures of outer scales and inner scales were maintained at between  $-7^{\circ}\text{C}$  and  $-5^{\circ}\text{C}$  throughout the winter months, while those of florets and bracts markedly increased from  $-12.6^{\circ}\text{C}$  to  $-6.0^{\circ}\text{C}$  and from  $-10.4^{\circ}\text{C}$  to  $-5.6^{\circ}\text{C}$ , respectively from late October to February. In winter flower buds exposed to subfreezing temperatures showed ice crystals located in the space between florets and bracts and within scales where ice nucleation activity was fairly high. This relationship implies that cold hardiness may be controlled by the balance of supercooling and ice nucleation in various tissues. The perennial tree has both easy freezing and supercooling tissues where they are localized in the right place according to circumstances to protect tissues against cold stress.

3. Ice formation and propagation in the flower and young fruit of Japanese pear were investigated with infrared (IR) video thermography imaging system. The changes of thermal response (exotherm) in freezing events

could be detected using the infrared thermography camera with exotherm rise accompanied by a marked color change in the tissues. With first bloom flowers, the temperature of peduncles decreased faster than that of the receptacle; the initial ice nucleation occurred primarily in petals, sepals and/or receptacle. Subsequently, ice was propagated along the peduncle. The temperature of receptacles was above that of peduncles during the freezing test at full bloom; the sepals and/or receptacle were initially frozen, then ice nucleation was extended to the petals along the peduncle. After blooming, high ice nucleation temperatures were observed in the petal, receptacle, sepal and pedicel while those of both the stamen and pistil remained very low. The more sensitive tissues to spring frosts were different from the sites where ice nucleation activity is high. These results suggest that the sepals and/or receptacle where the initial nucleation occurred may be an intrinsic or extrinsic source of high ice nucleation activity in flowers of the Japanese pear.

4. Effects of n-propyl dihydrojasmonate (PDJ) treatment on flowers of Japanese pear during spring frost were investigated to study

mechanisms for avoiding spring frost injury. PDJ applied during the flowering period resulted in a lower injury index for the ovules and pistils after freezing tests. Average ion leakage in control flowers was 37.9% during the balloon stage at  $+5^{\circ}\text{C}$ , while the flowers treated with PDJ displayed a 16.6% ion leakage. Similarly, at the full bloom stage, PDJ treatment reduced ion leakage at  $-5^{\circ}\text{C}$  from 73.1% to 47.8% in the control. The organs of the flower more sensitive to low temperature stress were the ovule, pistil and ovary, but stamens were more resistant. Sugar content in the flower at the balloon stage was increased by PDJ when treated at the pink stage. Moreover, free amino acids, especially proline, and ABA increased similarly with PDJ treatment. It is suggested that increasing endogenous ABA levels accompany sugar accumulation and controls osmotic pressure in cells stimulated by PDJ treatment to the flower of Japanese pear. These results show that PDJ affects supercooling capacity of a flower by changing solute content and protects organs from freezing.

From a practical viewpoint, the present results may be useful for designing frost protection programs for horticultural crops.