

リンゴの花芽分化と開花誘導に関する研究

2021

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻
(岩手大学)

劉 嘉儀

目次

序論	1
I. リンゴ実生を早期に相転換させるための育成法の検討.....	5
緒言	5
実験 1. 水耕栽培における培養液の検討	8
材料および方法.....	8
結果	11
考察	17
実験 2. <i>M. hupehensis</i> の水耕栽培による早期相転換の検討.....	20
材料および方法.....	20
結果	22
考察	31
II. リンゴ実生の相転換に関する内生植物ホルモン動態の解析.....	34
緒言.....	34
実験 1. <i>M. hupehensis</i> の同一樹における相転換と植物ホルモン動態の関係	36
材料および方法.....	36
結果	40
考察	46
III. リンゴにおける花芽分化特性の解明.....	49
緒言.....	49
実験 1 ‘Snowdrift’における花芽分化、休眠および植物ホルモンの関係	51
材料および方法.....	51
結果	56

考察	65
実験 2 ‘Snowdrift’ における花芽分化限界時期の把握	68
材料および方法	68
結果	69
考察	84
IV. リンゴ 5 品種の休眠特性と低温要求の評価	86
緒言	86
材料および方法	89
結果	93
考察	106
総合考察	111
摘要	117
謝辞	120
引用文献	121

序論

現代における果樹の品種改良は、食味、貯蔵性、耐病性、樹体管理の容易さなど消費者および生産者の様々な需要に基づいて展開されている。しかし、変化する消費者の好みや新規病虫害の発生などに対応し、果樹の新品種を迅速に育成することは困難である (Nocker and Gardiner, 2014)。その原因は、果樹は播種してから初開花まで長い幼若期間があることと、花芽分化後、開花するまでに休眠期間があることである。

リンゴ (*Malus × domestica* Borkh.) は、2013 年の世界における年間生産量が約 8 千万 t あり、最も重要な品目の一つである。日本でリンゴの栽培が開始されてから 140 年以上が経過した。消費者や地域の栽培条件に適した品種を選抜するため、何百もの輸入品種が試作され、何百もの新たな品種が開発された。伝統的なリンゴの育種方法は、何千もの実生からの優れた個体の選抜と交配の繰り返しであるが、その長い幼若相が育種年限を長引かせる原因となる。

リンゴの場合、播種から開花までに 7~9 年を要するため、品種育成に 20 年以上の年月がかかってしまう。このようなリンゴの育種年限を短縮するためには、まず幼若期間を短縮する必要がある。播種から開花までの期間を短縮させることができれば、品種育成の期間を大幅に短縮することができる。

リンゴの幼若期間を短縮するために、いくつかの研究が進められてきた。耕種的な方法として、最適な環境条件でリンゴの栄養生長を持続させ、開花可能な生理状態にさせ、その後、低温や摘葉処理により開花させる方法がある (Aldwinckle, 1975 ; Zimmerman, 1971)。生物工学的な方法として、Kotoda et al. (2006) は、リンゴの *MdTFL1* 発現を低下させた組み換え体を作成し、温室内で接ぎ木後 8 か月で開花させた。また、Sasaki et al. (2011) は、*MdTFL1* を導入した ALSV をリンゴに接種し、接種後約 2 か月で花芽形成させた。このように形質転換技術やウイルスベクターにより早期開花が可能である。さ

らに、リンゴでゲノム編集技術が確立されたことから (Nishitani et al., 2016)、近い将来、ゲノム編集技術による早期開花も可能になると考えられる。

しかし、リンゴの幼若相から成熟相への相転換の生理機構はいまだ不明である。相転換の研究を進展させるためには、再現性のある育苗システムによる正確な相転換時期の特定が必須である。しかし、リンゴ栽培種はヘテロ性が高いため、相転換の試験に遺伝子型が揃った実生集団を供することができず、正確な相転換時期を把握することは不可能である。そこで、アポミクシス（無配偶生殖性）を有し実生集団の遺伝子型が完全に同じになるリンゴ属野生種 *M. hupehensis* (Olien, 1987) を実験に用いることで、上記の課題を解決する。

また、育種年限の短縮には、相転換した実生を花芽分化後なるべく早く開花させることも必要である。花成・開花を自在に制御できるようになれば、育種における1世代に要する時間の短縮だけでなく、花成・開花・果実肥大の研究が時期にとらわれずに実施できるようになる。リンゴは通常の栽培条件では6月頃に花芽分化し(田村ら, 1987)、花芽は落葉期までに発達する (Faust, 1989)。その後、休眠を経て、翌春開花する。この過程を短縮するためには、花芽分化・発育と休眠に関わる生理機構を解明する必要がある。

芽の休眠は、生理的なシグナルや外部環境に影響される。Lang et al. (1987) は、休眠を条件的休眠期、自発休眠期および他発休眠期の三つの期間に分類した。花芽は新梢伸長停止後に分化し、条件的休眠期間中に完成する。条件的休眠期では、新梢の強剪定や摘葉などの刺激により開花させることが可能である (Liu et al., 2018)。その後自発休眠に入ると、ある一定の低温を与えないと萌芽しないため、自発休眠中には開花誘導処理はできない。低温要求量を満たした後、加温により開花が可能になる。そこで、条件的休眠期に開花誘導するためには、花芽の着生や花芽分化の進行と条件的休眠期から自発休眠への移行時期を解明する必要がある。植物ホルモンの関与を含め、成長調節因子

が生長と休眠サイクルの制御において果たす役割はまだほとんど解明されていない (Cooke et al., 2012)。その原因のひとつに、一般的な栽培品種は、枝により花芽分化の有無や時期が大きく異なり、条件の揃った材料を得にくいことが挙げられる。そこで、本研究では腋芽の花芽着生が毎年安定して非常に優れ、枝が二次伸長しない‘Snowdrift’を用いて (鶴飼・菊地, 2007)、花芽分化・発育と休眠に関わる生理機構を解明しようとした。

インドネシア西部のジャワ高地では、リンゴ‘Rome Beauty’において収穫の1か月後にすべての葉を摘み取って、強制的に萌芽させ、年2回の収穫が可能である (Janick, 1974; 湯田ら, 1981)。このことから、花芽を強制的に萌芽させるための摘葉の適期は、結果枝に花芽が分化し、かつ花芽が条件的休眠の状態にあるときであると推察される。従って、我が国においてもリンゴの休眠特性を把握することによって、リンゴ樹を自発休眠開始前の条件的休眠期に開花誘導できれば (Watanabe et al., 2018)、加温や補光によりハウス内で従来と異なる時期に果実を収穫することができると考えられる。

そこで本研究では、リンゴ実生を早期に相転換させ、開花を誘導する技術を開発するための基礎的資料を得るために以下の実験を行った。第1章では、*M. hupehensis* の実生を水耕栽培し、より早期に相転換する再現性のある栽培システムを作ることを目的に、水耕栽培における培養液の条件と早期開花との関係を検討した。第2章では、リンゴ実生の相転換に関与する植物ホルモンを明らかにすることを目的に、初花成する *M. hupehensis* 実生の相転換時の葉におけるアブシジン酸およびジベレリン量の変化を調査した。第3章では、リンゴの花芽分化、休眠と植物ホルモンの関係を解明することを目的に、花芽着生が非常に良くて規則的である‘Snowdrift’を用いて、同じ時期に伸長を停止した枝の花芽分化・発育および休眠とアブシジン酸およびジベレリンとの関係を解析した。また、リンゴにおける花芽分化の限界時期を解明することを目的に、‘Snowdrift’の新梢を6月以降に剪除し、その後発生する新梢の長さ翌年の開花状況を調査した。

第4章では、リンゴにおける新しい作型の開発や育種年限の短縮のための基礎的知見を得ることを目的に、日本のリンゴ主要品種と、インドネシアで二期作に使用されている‘Rome Beauty’ (Janick, 1974; 湯田ら, 1981) の5品種における休眠特性と低温要求を同一圃場で3または4年間調査した。

I. リンゴ実生を早期に相転換させるための育苗方法の検討

緒言

現在、果樹を含むほとんどすべての農産物は、食味、貯蔵性、収量、着色および耐病性など、従来からの目標に焦点を当てた継続的な育種プログラムにより育成されたものである (Nocker and Gardiner, 2014)。このような取り組みによって高品質な商用栽培品種の育成に成功し、現在の高度な生産体制と相まって高品質な農産物の生産が可能になった。しかし、変化していく消費者の好みに対応して、新しい栽培品種を迅速に生み出す育種開発も非常に重要である。

木本植物であるリンゴは、播種してから初開花までの幼若期間を経過後初めて花成刺激に反応可能になる過渡相（相転換時期）を経て、毎年安定して花成が起こる成熟相へと移行する。しかし、*Malus* 属植物の幼若期間は 5~12 年あり (Zimmerman, 1972)、この長い年限が育種や相転換などの生理的研究の妨げとなっている。

優良品種の早期育成には、幼若相から成熟相への相転換促進技術の確立が極めて重要である。したがって、これまでもリンゴ実生の幼若相を短縮させ、早期に成熟相へ転換させることを目的とした研究が行われてきた。木本植物の幼若相の長さは、遺伝的要因と生育環境によって決定される。リンゴとナシの幼若相の長さは環境の影響を受け、樹勢が強いほど幼若相が短い (Visser, 1976)。したがって、光条件、水分条件、温度条件、肥料条件などに関して、成長を低下させる条件は幼若相から成熟相への移行を遅らせる。一方、成長に有利な条件は幼若相を短縮する可能性がある。Zimmerman (1971) は、*M. hupehensis* 実生を温室で連続的に生育させ、播種から 12 か月で開花したことを報告した。また、Aldwinckle (1975) は、適当な育成条件において、リンゴ実生が播種から 16~20 か月で開花したことを報告した。今後、播種から開花までの期間をさらに短縮させる栽培技術の開発が期待されている。

リンゴの相転換を促進するためには、相転換の生理機構を解明する必要がある。これまでに、リンゴの相転換はいくつかの遺伝子、植物ホルモンおよびタンパク質に影響されることが報告されている。リンゴでは、2つの *FLOWERING LOCUS T* 遺伝子の *MdFT1* と *MdFT2* が開花の調節において重要な役割を果たす可能性がある (Kotoda et al., 2010)。また、ポリフェノール化合物もリンゴ実生 (Jonathan × Golden Delicious) の相転換に関与する可能性がある (Zhang ら, 2008)。さらに、内生植物ホルモンのジベレリン (GAs) とポリアミンも種子植物の生殖生長に影響を与える可能性がある (Königshofer, 1990; Pharis and King, 1985; Rey et al., 1994)。一方、果樹の相転換に関わる形態の変化も検討されてきた。果樹における相転換の形態的指標として、枝の棘の有無、葉の大きさ、葉の軟毛の有無などが知られている。リンゴでは、Hatsuda et al. (2011) が相転換により葉の鋸歯数が減少することを示した。しかし、これらの研究では遺伝的な背景が多様な栽培品種の交雑実生を用いているため、結果の精度や再現性に問題があった。

相転換の研究を進展させるためには、再現性のある育苗システムによる正確な相転換時期の特定が必須である。しかし、リンゴ栽培種はヘテロ性が高いため、相転換の試験に遺伝子型が揃った実生集団を供することができず、正確な相転換時期を把握することはこれまでのところ不可能であったが、リンゴ属野生種でアポミクシス (無配偶生殖性) を有する *M. hupehensis* の実生集団は遺伝子型が完全に同じであり、上記の課題を解決する非常に有効な手段となり得る。

これまで *M. hupehensis* 実生の土耕栽培では初開花の年次にかかわらず、樹高 250cm に達すれば相転換することが示されている (小森ら, 2017)。一般に、水耕栽培は土耕栽培よりも生育が早いことが知られている。したがって、*M. hupehensis* の実生を水耕栽培し、より短期間で十分な樹高に育成することができれば、相転換時期を早めることができると思われる。

本研究では、*M. hupehensis* の実生を水耕栽培することで、より早期に相転換する再現性のある栽培システムを作ることを目的に、培養液の条件の検討と早期開花に及ぼす影響を検討した。

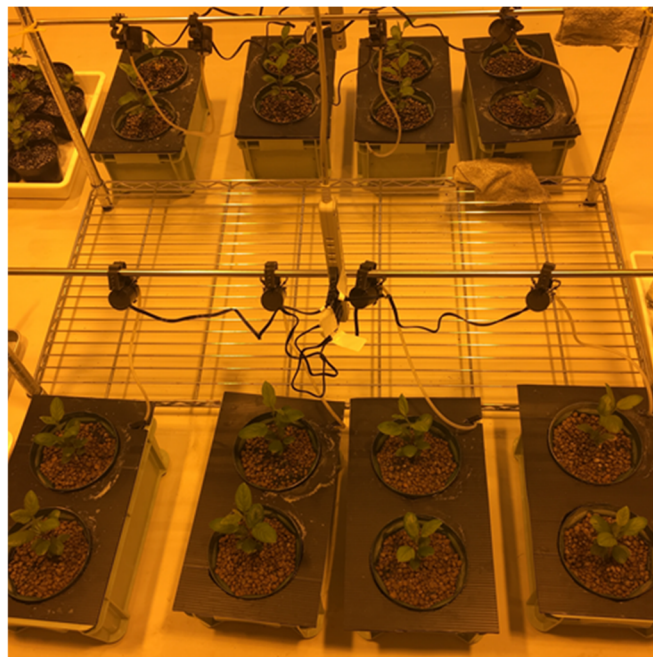
実験 1. 水耕栽培における培養液の検討

材料および方法

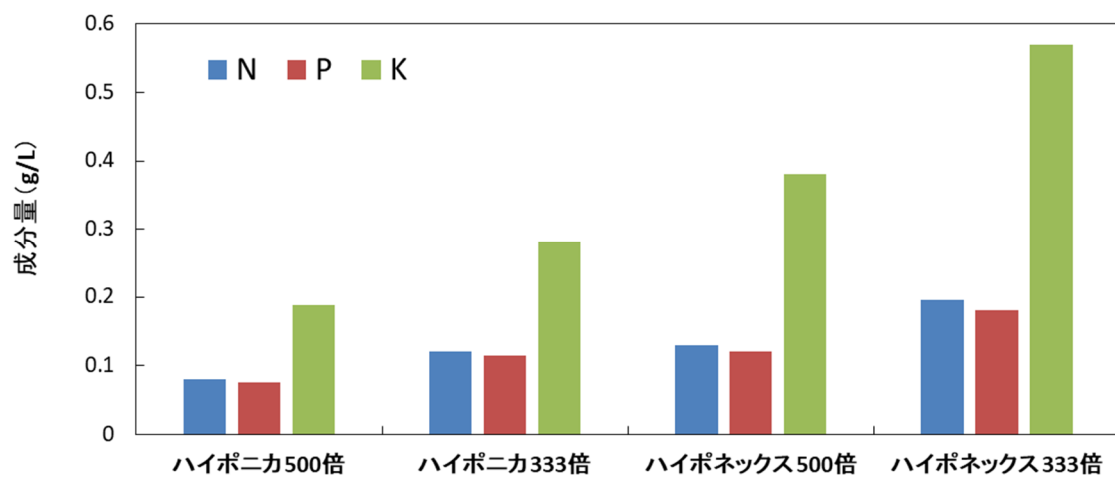
岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター滝沢農場で栽培されている *M. hupehensis* の種子を供試した。2018 年 5 月 25 日に乾燥種子を 0.1% 硫酸オキシシン (8-Hydroxyquinoline Sulfate Monohydrate) で消毒後、蒸留水を含ませたティッシュに 1cm 間隔で並べ、折り畳み、チャック付きビニール袋に入れ、冷蔵庫 (4°C) で低温処理した。2018 年 8 月 2 日に 25°C、高圧ナトリウムランプ (USHIO HILux Gro Super HPS600W) を光源とする 24 時間光条件の恒温室において、培養土を入れたセルトレイに播種し、発芽させた。播種 1 か月後に実生を土耕および水耕に分けて栽培した。土耕栽培は、水耕栽培と比較するために設けた。土耕栽培では、播種 1 か月後に 75 個体を培養土：パーミキュライト：赤玉土=3：1：1 を充填した直径 9cm のビニールポットに移植した。水耕栽培では、播種した約 1 か月後の 2018 年 9 月 10 日に直径 15cm、高さ 17cm のスリット入りプラ鉢に支持体としてハイドロボールを充填し、9.5L 容の水耕栽培容器あたり 2 鉢を置いた (第 1.1.1 図)。培養液には、ハイポニカ液体肥料 (協和株式会社) (以下、ハイポニカ) (N : P : K = 4 : 3.8 : 9.4) および微粉ハイポネックス (株式会社ハイポネックスジャパン) (以下、ハイポネックス) (N : P : K = 6.5 : 6 : 19) を用いた。ハイポニカ 500 倍処理区、ハイポニカ 333 倍処理区、ハイポネックス 500 倍処理区およびハイポネックス 333 倍処理区の 4 処理を設け (第 1.1.2 図)、各区 4 樹供試した。ポンプにより培養液に連続的に空気を送り、培養液は週 2 回交換した。各個体の樹高を 2018 年 11 月 16 日 (播種後 3 か月半) から 2 週間間隔で伸長停止まで調査した。

水耕栽培の個体が 2019 年 3 月中旬に伸長を停止したため、2019 年 4 月 24 日に滝沢農場における畑地の火山灰土を用いた土耕栽培 (21cm ポット) に移植した。伸長停止時の樹高は 140.5~236.5cm で、平均は 193.1cm であった。土耕栽培に移行した後、こ

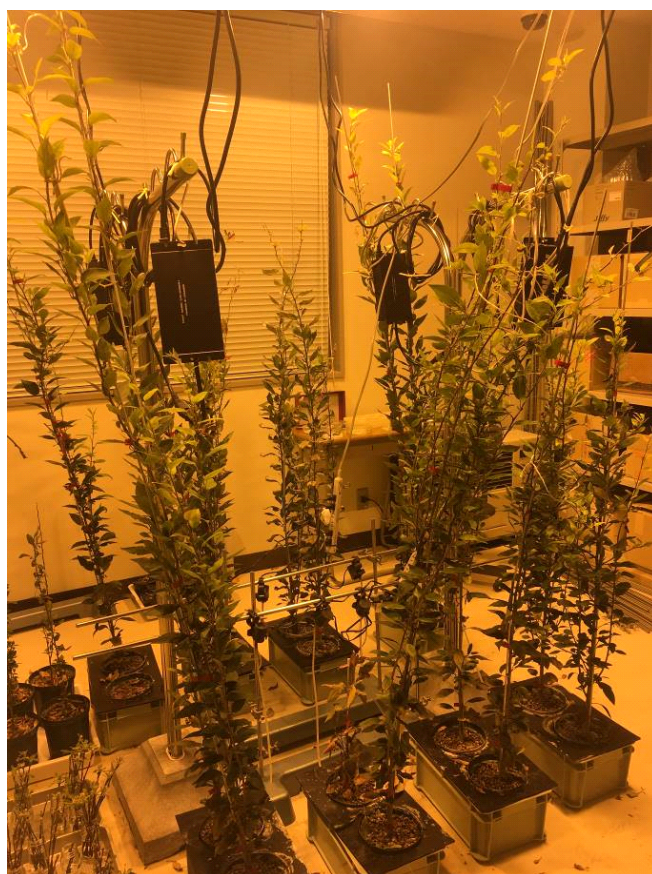
これらの個体の生育は悪く、大部分の葉は落ちた。2019年5月28日に、これらの個体を圃場へ移植して自然環境下で管理し、経過観察した。同じ日に、当初から土耕栽培していた個体も圃場へ移植した。2019年9月1日に主幹および側枝の伸長量、地上高30cmの幹周および主幹節数を調査した。2019年12月24日に水耕栽培から土耕栽培へ移行した個体を再び恒温室へ戻し、萌芽させた。その後、開花状況を調査した。



第 1.1.1 図 水耕栽培開始 1 か月後（播種後 2 か月）の *M. hupehensis* 実生



第 1.1.2 図 ハイポニカおよびハイポネックスの主成分含有量



第 1.1.3 図 水耕栽培開始 5 か月後（播種後 6 か月）の *M. hupehensis* 実生

結果

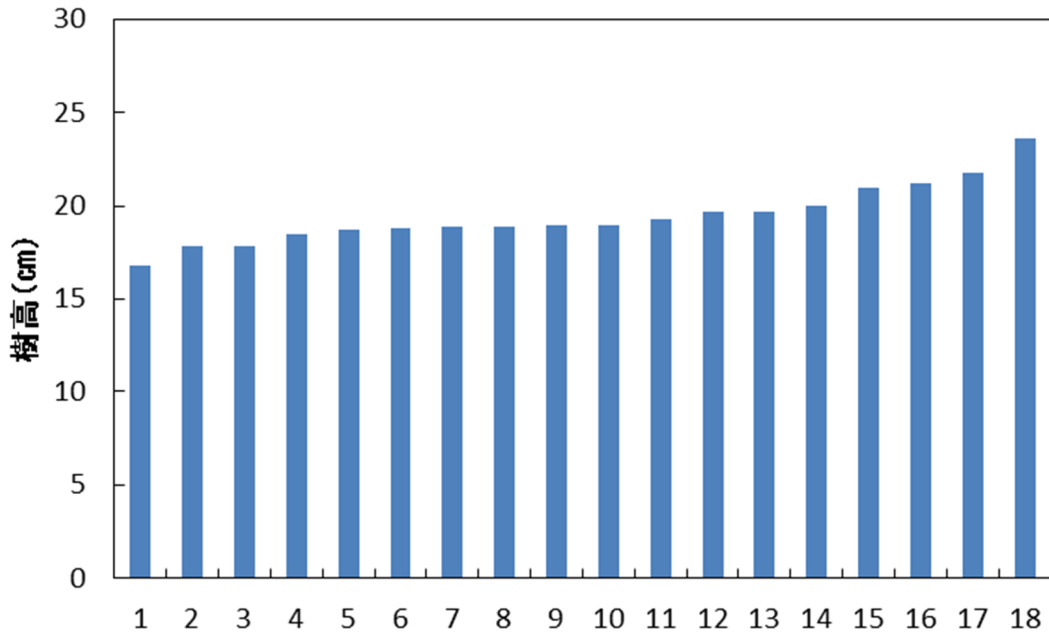
1) 培養液の違いが水耕栽培における生育に及ぼす影響

水耕栽培と比較するために土耕栽培した 75 個体のうち、移植 2～3 か月後（播種後 3～4 か月後）に 47 個体が生育不良で枯死した。残りの個体は移植 2.5 か月後（播種後 3.5 か月後）までに伸長停止した。伸長停止時の樹高は 16.8～23.6cm、平均樹高は 19.5cm であった（第 1.1.4 図）。

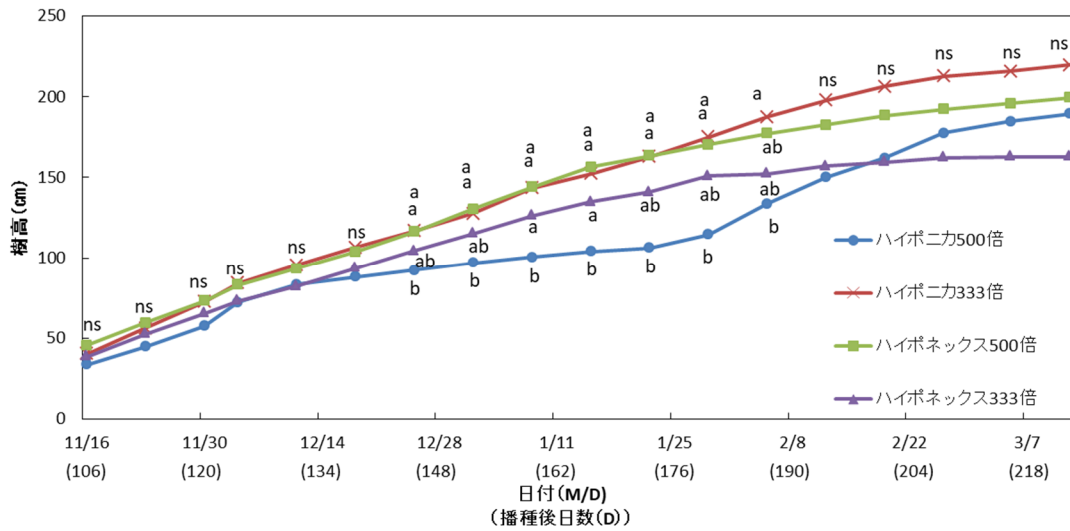
ハイポニカ 333 倍処理区およびハイポネックス 333 倍処理区では、各 1 樹が初期生育の不良で枯死した。これらを除いた各処理区における平均樹高の推移を第 1.1.5 図に示した。

播種後 133 日（2018 年 12 月 25 日）から播種後 180 日（2019 年 1 月 29 日）までの樹高はハイポニカ 333 倍処理区とハイポネックス 500 倍処理区が最も高く、ハイポニカ 500 倍処理区は最も低く推移した。ハイポネックス 333 倍処理区はその中間を推移した。播種後 194 日（2019 年 2 月 12 日）以降、各処理区の樹高に差はなかった。伸長停止時の平均樹高は、ハイポニカ 333 倍処理区とハイポネックス 500 倍処理区で、それぞれ 219.8cm と 199.4cm であった。ハイポニカ 500 倍処理区とハイポネックス 333 倍処理区の平均樹高は、それぞれ 189.4cm と 162.8cm であった。

伸長停止後の 2019 年 4 月 24 日に各個体は水耕栽培から土耕栽培へ移行した。いずれの個体もうまく吸水できずにほとんど落葉したが、枯死には至らなかった。



第 1.1.4 図 土耕栽培した個体の移植 3 か月後の樹高



※調査日ごと異なる英小文字間に Turkey-HSD 検定により 5%水準で有意差あり

第 1.1.5 図 培養液の種類と濃度が *M.hupehensis* 実生の樹高に及ぼす影響

2) 開花個体の生育特性

調査した 14 個体の 2019 年 8 月 30 日における樹高は 136.2~258.0cm で、平均は 186cm であった。総伸長量は 267.9~1269.3cm で、平均総伸長量は 929.1cm であった。地上高 30cm の幹周長は 0.8~5.4cm で、平均幹周長は 3.5cm であった。節数は 72~128 節で平均節数は 102.5 節であった。播種後約 13 か月の 2019 年 8 月 30 日に、ハイポネックス 333 倍処理区における 1 個体で開花を確認した (第 1.1.6 図)。不時開花であった。この個体の樹高は 201.5cm、総伸長量は 920.7cm、地上高 30cm の幹周長は 3.5cm であった (第 1.1.1 表)。開花部位は樹体の頂端で、節数は 94 節目であった。すべての個体を恒温室へ再び戻した後の 2020 年 1 月 6 日に同一個体のもう 1 か所に蕾を確認した。蕾の部位は、主幹の地上高 160.5cm から発生した 4.8cm の新梢の頂芽であった。また、2020 年 1 月 10 日にハイポネックス 500 倍処理区の 1 個体の 5 か所に開花を確認した (第 1.1.7 図)。樹高は 258.0 cm、総伸長量は 275.8 cm、地上高 30 cm の幹周は 4.1 cm であった (第 1.1.1 表)。蕾の部位は主幹の地上高 240.5~256.1cm、節数は 119、122、123、124 および 125 節目であった。さらに、同日にハイポニカ 333 倍処理区の 1 個体で蕾を 3 か所確認した。この個体の樹高は 226.0cm、総伸長量は 560.1cm、地上高 30 cm の幹周は 3.9cm であった (第 1.1.1 表)。蕾の部位は、地上高 180.6~190.0cm で、節数は 93、95 および 99 節目であった。

開花樹の平均樹高、地上高 30cm の幹周長、主幹節数は、それぞれ 228.5cm、3.8cm、112 節でいずれも全体平均値の 186.0cm、3.5cm、102.5 節より高かった。全体の平均総伸長量は 629.1cm であったが、開花樹の平均総伸長量は 585.5cm で、未開花樹の平均総伸長量は 640.9cm あった。樹高と樹体の主幹および側枝の総伸長量の相関図を第 1.1.8 図に示した。150cm 以上の個体に限定すると、樹高と総伸長量に負の相関 ($r = -0.857$) がみられた。



第 1.1.6 図 播種後 13 か月で開花した *M.hupehensis* 実生(白丸は開花部位を示す)

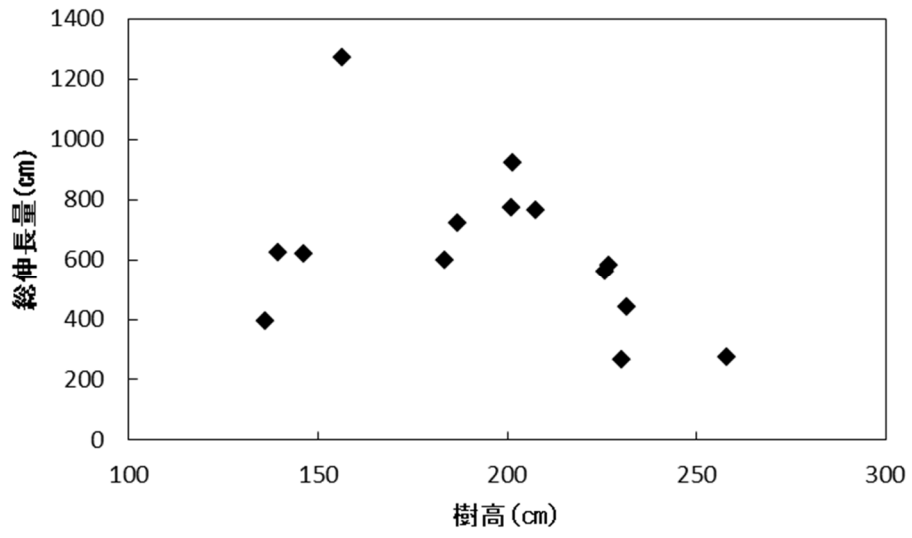
第 1.1.1 表 水耕栽培した *M. hupehensis* 実生の播種 13 か月後の生育量

培養液	樹高 (cm)	総伸長量 (cm)	地上高30cmの幹周 (cm)	節数
ハイボニカ500倍	187.0	720.0	3.7	104.0
	183.5	599.1	3.8	107.0
	207.5	763.5	3.1	122.0
	201.3	772.8	3.5	119.0
ハイボニカ333倍 ※	156.3	1269.3	5.4	81.0
	226.0	560.1	3.9	114.0
	230.2	267.9	3.9	125.0
ハイボネックス500倍	※ 258.0	275.8	4.1	128.0
	231.8	438.6	3.8	116.0
	227.0	581.2	4.2	107.0
	146.1	619.6	3.2	72.0
ハイボネックス333倍	139.4	625.2	3.3	74.0
	136.2	393.0	3.2	72.0
	※ 201.5	920.7	3.5	94.0
平均値	195.1	629.1	3.8	102.5
開花樹平均値	228.5	585.5	3.8	112.0
非開花樹平均値	186.0	640.9	3.7	99.9

※：開花個体



第 1.1.7 図 2020 年 1 月 10 日ハイボネックス 500 倍処理区に開花



第 1.1.8 図 樹高と総伸長量の相関関係

考察

福島県農業総合センター果樹研究所では、加温ハウスにおいて *M. hupehensis* の実生を土耕栽培し、播種後 6 か月で樹高が 200cm 以上に達した。しかし、本試験における土耕栽培では、セルトレイから 9cm ビニールポットへ移植後の生育が遅く、多くの個体は移植後 2~3 か月で枯死した。枯死した個体だけでなく、生き残った個体でも葉に褐斑が生じ（第 1.1.9 図）、その後落葉に至る場合が多かった。褐斑が生じ始めた個体を光源に蛍光灯を用いた人工気象器へ移したところ、新たな褐斑は発生しなかった。これは、本試験で用いた光源が土耕栽培に適していなかったのかもしれない。その他、土壌資材の種類や施肥方法が人工気象条件下での栽培に適していなかった可能性もある。

水耕栽培では、ハイポニカ 333 倍処理区およびハイポネックス 333 倍処理区の各 1 樹が初期生育の不良で枯死した。いずれも高濃度の肥料を与えた処理区であったため、生育の悪い個体が肥料の濃度障害を受けたことが原因と考えられた。生長停止後の樹高はハイポニカ 333 倍処理区で最も高かったが、枯死した個体が多かったハイポネックス 500 倍処理区が水耕栽培の培養液に適していると考えられた。

Atay (2020) は、リンゴの交雑実生において樹高だけでなく、樹幹断面積も相転換に大きな影響を与えることを報告した。また、小森ら (2017) は、*M. hupehensis* 実生を 3 または 4 年間育成し、樹高と幹周が花成の指標として精確であることを報告した。本研究でも、*M. hupehensis* の実生における開花樹の樹高、地上高 30cm の幹周長および主幹節数は、いずれも全個体の平均値よりも高かった。これは樹高、幹周長および主幹節数の増加が相転換を促進することを示唆している。しかし、総生長量は相転換と関係がみられなかった。これは、多数の側枝が生長すると主幹の生長が抑制され、樹高が低くなったためである。したがって、相転換を促進するためにできるだけ短期間に樹高を増加させ、主幹を肥大させるためには、側枝の剪定が必要であると考えられた。

本実験では、播種後約 13 か月（2019 年 8 月 30 日）でひとつの個体が樹高 201.5cm

の頂端に開花した。同個体は2019年12月24日に恒温室へ移設したあと、播種後約17か月（2020年1月6日）に樹高160.5cmでも開花した。通常の花芽分化時期を考慮すると、頂端で開花した2019年8月30日から個体を恒温室へ移設する2019年12月24日までの間に、この部位の花芽分化が自然条件で生じたとは考えにくい。したがって、2020年1月6日に樹高160.5cmで開花した花芽も最初に開花した2019年8月30日以前に花芽分化していたと考えられる。一般に、相転換は樹体の頂端から基部に向かって進行することが知られている（Hatsuda et al., 2011）。このため、8月30日時点で相転換は樹体の頂端から約40cm部位まで進行しており、樹体の頂端では、8月30日よりもかなり前に相転換していたものと推察された。しかし、本実験では、その正確な時期を把握することはできなかった。

以上の結果、水耕栽培はリンゴ実生の早期開花に有効な手段であると推察された。しかし、開花した個体は14個体中3個体のみであったため、今後、再現性を高めるために栽培方法のさらなる検討が必要である。



第 1.1.9 図 土耕栽培において褐斑が生じた

実験 2. *M. hupehensis* の水耕栽培による早期相転換の検討

材料および方法

岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター滝沢農場で栽培されている *M. hupehensis* の種子を供試した。2019 年 5 月 2 日に実験 1 と同じ方法で種子を低温処理した。2019 年 6 月 13 日以降、低温処理中に発芽し始めた種子は湿らせたろ紙を入れたシャーレへ移し、実験 1 と同じ恒温温室で管理した。これらの実生は、土耕および水耕で栽培した。

土耕栽培では、2019 年 6 月 25 日に発芽し、発根した個体を培養土を充填したセルトレイに移植した。その後、樹高 10cm 程度に伸長した 65 個体を培養土：バーミキュライト：赤玉土=3：1：1 を充填した直径 9cm のビニールポットに順次移植し、同上の恒温温室で栽培した。2019 年 8 月 22 日から 12 月 25 日まで約 1 か月に一回、普通化成 (N：P：K=8：8：8) をビニールポットあたり 2g 与えた。また、9 月、10 月および 11 月には普通化成と同時にマグホス (P：Mg=17：3.5) をビニールポットあたり 1g 与えた。

水耕栽培では、シャーレ内で発芽し、発根した 44 個体を 2019 年 6 月 25 日に水耕容器に移植した。水耕容器は、水道水を入れたバットにセルトレイを重ねて置き、支持体としてセルに水耕栽培用の小石を充填した容器を使用した。これに加え、シャーレ内に残っていた 16 個体を 2019 年 7 月 4 日に水耕容器に播種した。その約 1 か月後に、すべての個体を以下の水耕栽培に移行した。直径 15cm、高さ 17cm のスリット入りプラ鉢に支持体として hidroボールを充填し、9.5L 容の水耕栽培容器あたり 2 鉢を置いた。肥料管理は 2018 年の試験で樹高が高く、生育が安定していたハイポネックス (N：P：K = 6.5：6：19) 500 倍希釈液を用いた。樹高の伸長を促すため、腋芽から発生した新梢は全部剪定し、主幹だけ残した (第 1.2.2 図)。

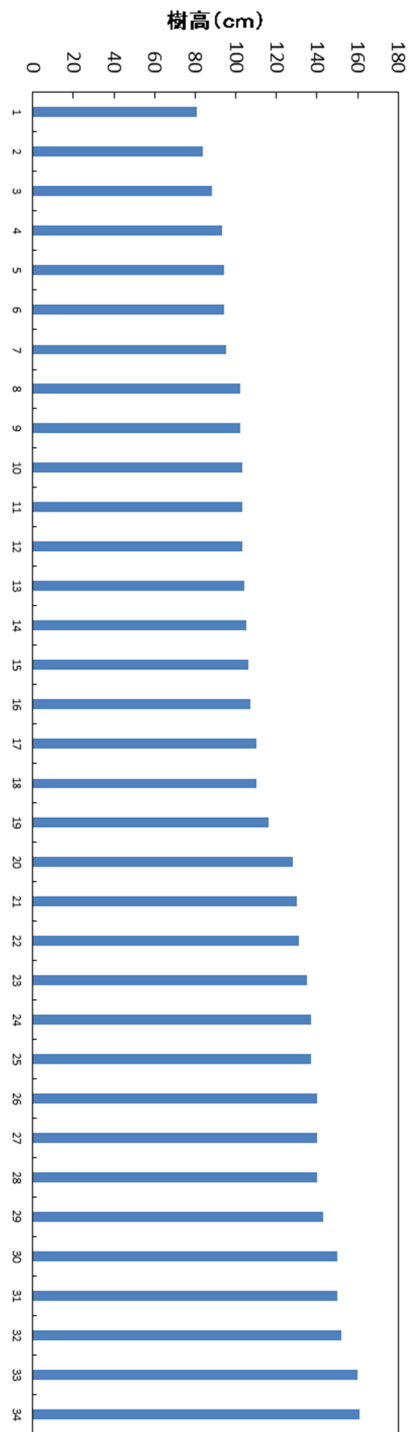
2020 年 5 月 1 日に水耕栽培していた個体を 21 cm ポットを用いた土耕栽培に移行し

た。土壌には、滝沢農場の非耕作地から採取しオートクレーブで高温殺菌した火山灰土を用いた。これらの個体は、6月下旬に圃場へ移設して、自然環境下で管理し、経過観察した。

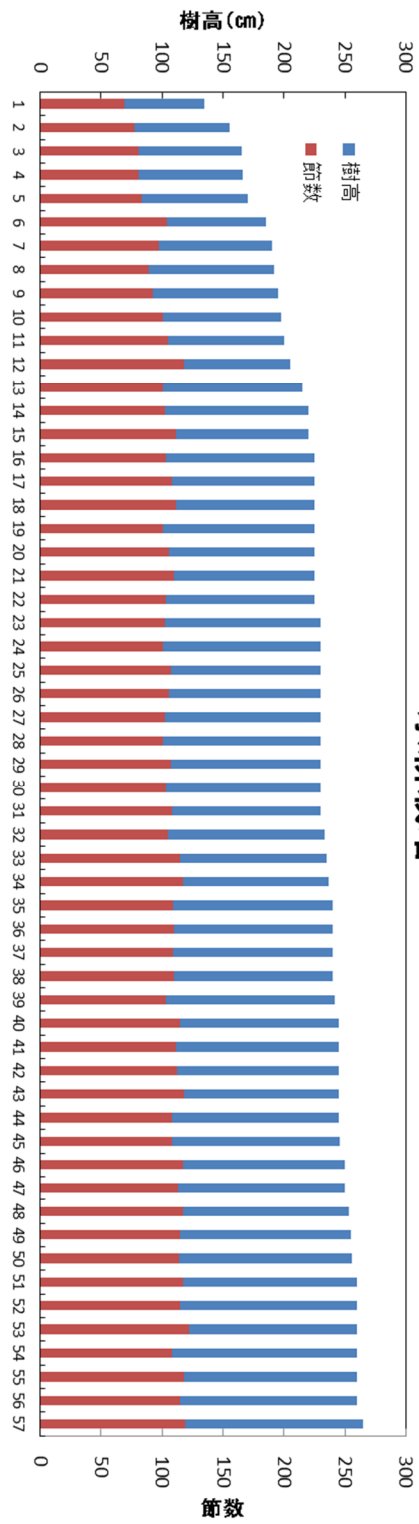
結果

1) 2019年水耕栽培および土耕栽培による生長調査

伸長停止後の平均樹高は、土耕栽培では 118.6cm、水耕栽培では 226.7cm であった。土耕栽培では、栽培した 65 樹中ほとんどの個体は播種後 5~6 か月で伸長停止し、伸長が止まった時点で 34 樹が生存した。樹高は 81~161cm で、200cm を超えた樹体はなかった（第 1.2.1 図）。水耕栽培では、栽培した 60 樹中、57 樹が生存したが、播種後 7~8 か月で伸長停止した。樹高は 135~265cm で、節数は 69 節~122 節で、200cm 以下の個体は 10 樹、200~240cm の個体は 24 樹、240cm 以上の個体は 23 樹であった（第 1.2.1 図）。播種 10 か月後の地面から 30cm の平均幹周長は 3.21cm、播種 10 か月後土耕栽培地面から 30 cm の平均幹周長は 2.23cm であった。



土耕栽培



水耕栽培

第 1.2.1 図 2019 年水耕栽培および土耕栽培の生長量



第 1.2.2 図 恒温室における水耕栽培の様子

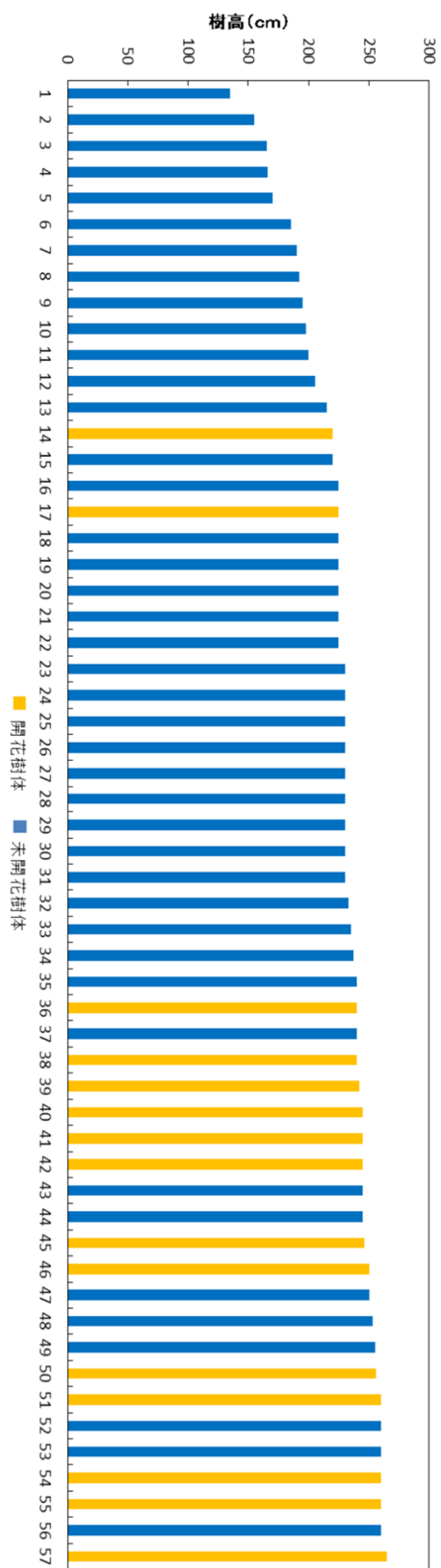
2) 2019 年に播種した水耕栽培個体の開花

2020 年 5 月 6 日に水耕栽培した複数の個体が開花した (第 1.2.3 図)。この時点で、すでに直径 5mm 程度の果実になっていた個体もあった (第 1.2.4 図)。5 月 8 日に開花状況を調査したが、調査日以前の開花時期は不明であったため、開花後同じ直径の果実になるまでに必要な日数から開花日を推定した。推定により一番早い開花時期は 4 月 18 日であり、2019 年 6 月 25 日の播種から開花までの日数は 9 か月 20 日であった。この個体の樹高は 242cm であった。開花した個体は 57 樹中 15 樹であり、開花率は 26.3% であった (第 1.2.3 図)。その中で樹高が 240 cm 以上の個体に限定すると、開花した個体は 23 樹中 13 樹であり、開花率は 56.5% であった。240cm 以下の開花率は 5.9% であった。樹高 240cm 以下の個体のうち、36 および 38 番の個体は露地へ移動後に開花した。

開花日はそれぞれ6月30日と7月2日であった。

開花樹の花そう数は1樹あたり1~11花そうであった。開花した節位は75~114節で、開花の最も多い節位は91~95節であった(第1.2.5図)。その次に開花の多い節位は96~100節、続いて81~85節、101~105節の順であった(第1.2.5図)。開花した節位の地上高は150~260cmであり、開花の最も多い地上高は210~220cmであった。その次に開花の多い地上高は180~190cmであった(第1.2.6図)。開花が最も多かった期間が5月11日~20日(播種後318~327日)(第1.2.7図)、その次は4月21日~5月10日(播種後298~317日)であった。地上高30cmの平均幹周長は3.21cmで、開花個体の幹周長は3.64cmであった(第1.2.8図)。

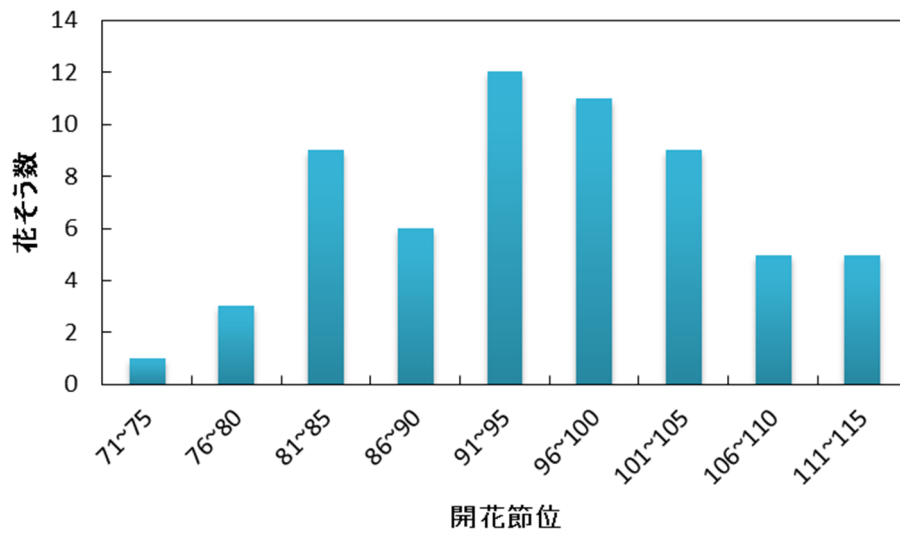
恒温室には6つの光源があり、多くの個体は光源から水平距離で1m以内の位置に配置されていた。しかし、水耕栽培した個体のうち、16樹は光源から水平距離で約200cm離れていた。その16樹の生長を第1.2.9図に示した。樹高は165~250cmであった。開花個体は2樹のみで、開花率は12.5%であった。その中で樹高が240cm以上の個体に限定すると、開花した個体は5樹中2樹であり、開花率は40.0%であった。



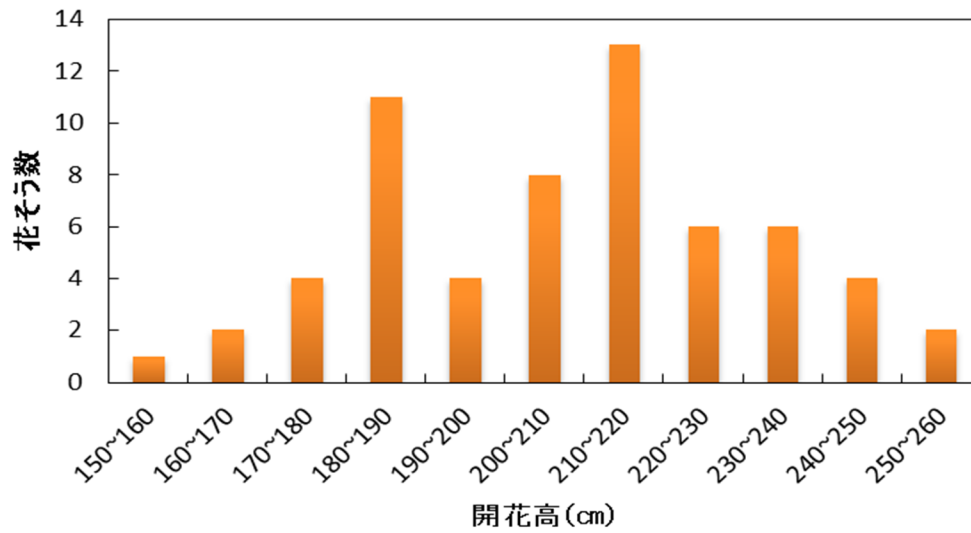
第 1.2.3 図 水耕栽培による播種後約 10 か月の樹高と開花



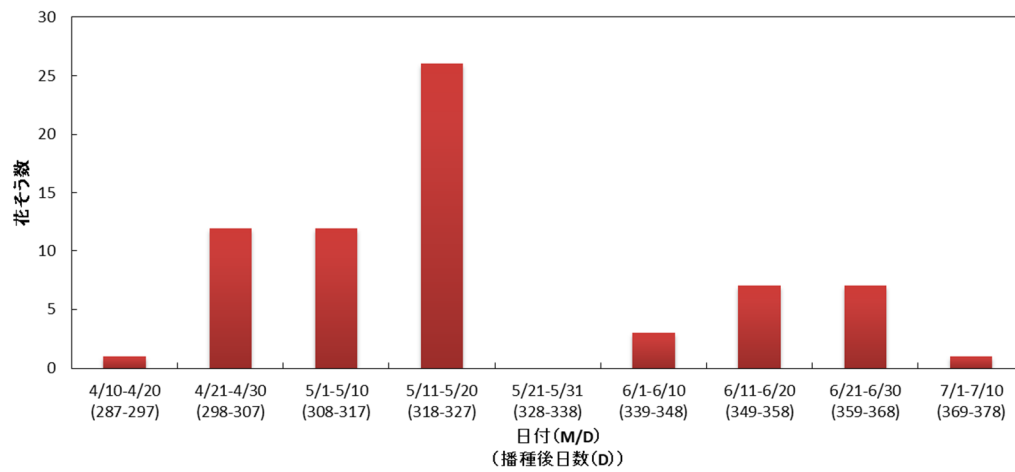
第 1.2.4 図 播種後 10 か月 8 日に観察した果実



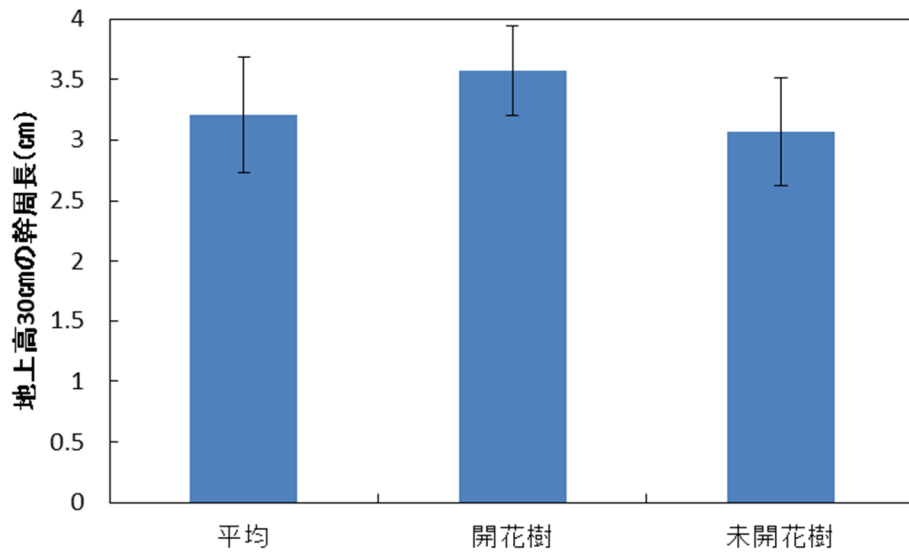
第 1.2.5 図 各節位における花そう数



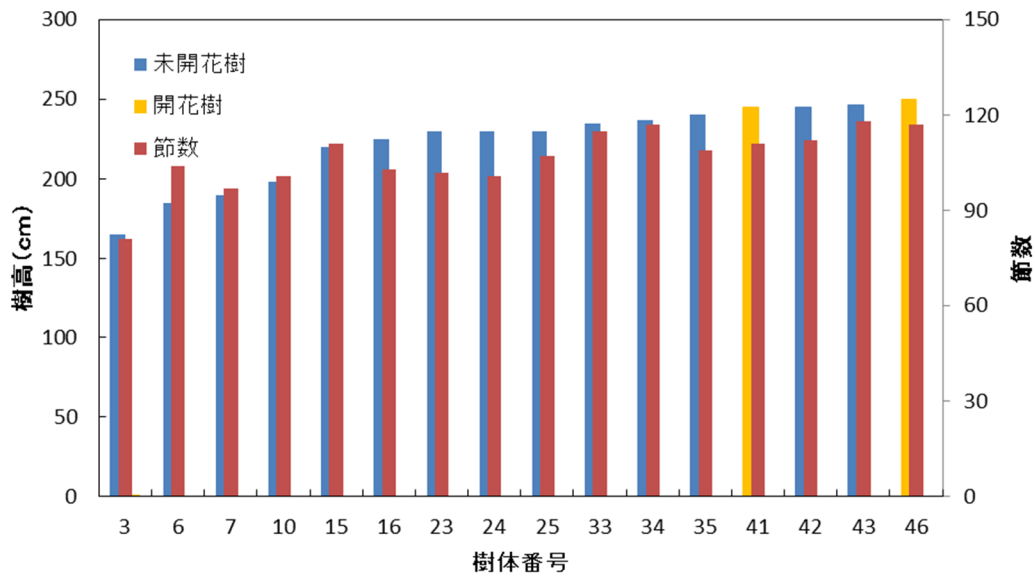
第 1.2.6 図 樹高別の花そう数



第 1.2.7 図 開花時期別の花そう数



第 1.2.8 図 水耕栽培による地上 30cm の幹周長



第 1.2.9 図 光源から水平距離で 200cm 離れた位置にある樹体の開花



図 1.2.10 *M.huphenensis* 播種後 10 か月の開花 (一部)

開花部位を黄色い毛糸で示した

考察

水耕栽培では 57 個体中 47 個体が樹高 200cm を超え、土耕栽培より生育は旺盛であった。土耕栽培では月一回に化成肥料を与えたため、2018 年に実施した実験 1 の土耕栽培より生長が早かった。しかし、土耕栽培では枯死した個体が多く、また生長速度も遅かったため、本実験の恒温室では、土耕は早期の相転換を目的とした栽培に適していないことが分かった。水耕栽培は、培養液にハイポネックス 500 倍希釈液を用い、側枝を剪定することにより生育が揃いやすかった。

最初の開花は 2019 年 6 月 25 日に播種した個体でみられ、果実の大きさから 2020 年 4 月 18 日に開花したと推定された。これまで、形質転換技術を用いずにリンゴ実生を最も早期に開花させた事例は、Zimmerman (1971) による *M. hupehensis* の実生を発芽から 12 か月で開花させた報告である。本実験では、播種から開花までの期間が最短で 9 か月と 20 日と推定された。また、実際に開花日を確認できた個体でも播種後 10 か月 6 日で開花した。これらの播種後から開花までの期間は、既往の報告より約 2 か月間短縮され、最も短かった。先に述べた Zimmerman (1971) の *M. hupehensis* の実生を発芽から 12 か月で開花させた試験では、樹高が 300cm を越えた 16 個体の中で 6 樹が開花した。本実験では、240cm 以上の個体の 23 樹中 13 樹であり、その開花率は 56.5% で、Zimmerman (1971) の結果より高かった。開花が最も多くみられた時期は 2020 年 5 月 11 日～20 日で、播種後 10 か月 7～22 日であった。これまでリンゴ実生の早期開花に関する研究は自然条件または温室条件で実施されてきたが (Aldwinckle, 1975 ; Visser, 1964 ; Visser, 1976 ; Zimmerman, 1971)、本実験により、完全に閉鎖された人工環境条件下でもリンゴ実生を相転換させることが可能であることが示された。また、水耕栽培により相転換させた報告もこれまでには見あたらない。以上の結果は、栽培条件が安定している恒温室での水耕栽培がリンゴ実生の早期相転換に有用であることを示している。

これまでの早期開花では、相転換した実生に対して、自然条件では光周期と低温、人工処理ではジベレリン阻害剤やストレスなどを与えることによって開花させたが (Zimmerman et al., 1985)、本研究において、安定した環境 (恒温、24 時間照明) で開花させることができた原因は、生長停止後の落葉の刺激であった可能性がある。Atay (2020) は、リンゴの実生が相転換し開花可能になる樹高は 200cm 以上であることを報告した。本実験においても開花した個体の樹高は、すべて 200cm 以上であった。その中で、樹高が 240cm 以上の個体は開花率が高く、樹高が 200~240cm の個体は開花率が低かった。この差には、幹周長が影響していた可能性がある (Kwon et al., 2007 ; Westwood, 1988)。樹高 200~240cm の個体のうち、未開花樹の地上高 30cm の平均幹周長 3.08cm に対し、開花樹の平均幹周長は 3.64cm であり、開花樹の主幹の肥大生長は未開花樹よりも旺盛であった。したがって、同程度の樹高を示す個体の中では、幹周長が大きいことが相転換を促進する要因であることが推察された。

本実験では、開花の最低節位は 75 節であった。開花が最も多かった節位は主幹の頂端ではなく 90~100 節で、その樹高は 200~220cm であった。本研究では次章で述べる相転換と植物ホルモンの関係を調査するために、供試した個体のうち 10 個体の 50、70、90 および 110 節前後の芽を採取したが、そのうち 9 個体が相転換し開花した。したがって、植物ホルモン分析用に採取した 90 節前後および 110 節前後の芽も相転換し花芽分化していた可能性がある。つまり、86~90 節および 100~110 節の開花数はもう少し多かったと推察される。このことを考慮すると、節数が 80 節以上、樹高が 180 cm 以上の部位で開花が多いと考えられる。

光源から水平距離で 100cm 離れると、照度および光合成有効放射強度は大幅に減少する (第 1.2.1 表)。光源から水平距離で 150~200cm 離れた個体は、生長が遅い傾向がみられ、これらの個体における開花率は、供試した個体全体の開花率よりも低かった。つまり弱光下では相転換が遅れる傾向があった (Aldwinckle, 1975)。また、オレンジは

光強度を低下させたとき芽の生長に影響しないが、花芽の形成が著しく少なくなるこ
 が報告されている (Tromp, 1982)。このように光条件 (照度、PAR) の低下は樹体の生
 長を抑制し、間接的に相転換および花芽分化も抑制した。したがって、光条件はリンゴ
 実生の早期開花に重要な環境条件であると考えられた。本試験では、個体の配置場所を
 移植の際に変更することはあったが、樹高が 1m を越えた頃からほとんど同じ場所で管
 理していた。今後、樹体生長、相転換および花芽分化を安定させるためには、定期的に
 個体の配置を変更し、光環境の違いの影響を小さくする必要がある。

本実験では、遺伝的な背景の揃った *M. hupehensis* の実生を用いて、完全人工環境下
 で水耕栽培し、播種から 10~12 か月で樹高 240cm 以上の個体の約半数を相転換させ開
 花させることができた。今後、光環境の均一化を図ることで相転換率をより高めること
 ができると考えられた。

第 1.2.1 表 光源からの距離別の照度および PAR

光源からの水平距離	光源からの垂直距離	照度 (lux)	PAR (μmol)
0cm (直下)	50cm	43,000	1,020
	100cm	19,000	370
	150cm	11,000	200
	200cm	6,500	130
50cm	50cm	16,000	450
	100cm	12,500	230
	150cm	8,000	140
	200cm	5,000	100
100cm	50cm	4,500	70
	100cm	4,000	68
	150cm	3,800	78
	200cm	3,500	69

II. リンゴ実生の相転換に関する内生植物ホルモン動態の解析

緒言

リンゴ実生では、播種から開花まで長い年月がかかる。開花前のこの長い期間は、おそらく長い幼若期と短い相転換期で構成されている (Zimmerman, 1971)。相転換は、幼若相から成熟相への移行であり、植物の発達における重要な現象である。

相転換には、いくつかの遺伝子およびタンパク質が関与することが知られている。*LFY* と *API* の過剰発現は、いくつかの植物種で早熟な開花を誘導した (Liljegren et al., 1999)。リンゴでも *BpMADS4*、*MdFT1* および *MdFT2* の過剰発現は、幼若相を短縮できる (Hanke and Flachowsky, 2010)。リンゴ交雑実生では、伸長中の新梢の節におけるタンパク質の量と質の変化で相転換の発生する節が判断された (Zeng et al., 2009) 報告がある。加えて、相転換はいくつかの植物ホルモンの影響も受ける。ジベレリン (GA_3 、 GA_{4+7}) 処理は、木本植物の開花を阻害し (Marcelle and Sironval, 1963 ; Pharis and King, 1985)、 GA_3 はリンゴの栄養生長を促進し、開花を抑制する (Zhang et al., 2016) ことが報告されている。

Zhang et al. (2008) は、‘紅玉’と‘ゴールデン・デリシャス’の2年生交雑実生における節位ごとのサイトカイニン量を測定し、樹皮における高レベルのイソペンテニルアデニン (iP) およびゼアチン (Z) と葉における高レベルのサイトカイニンの DHZR によって、実生が成年栄養相にあると判別できることを報告した。しかし、この報告では供試材料が栽培種の交雑実生であるため、結果に再現性がない。また、Xing et al. (2014) は、*M. hupehensis* 実生の幼若相と成熟相の葉における植物ホルモン量を測定し、オーキシン、サイトカイニンおよびアブシジン酸は幼若相よりも成熟相で高く、ジベレリンは成熟相よりも幼若相で高いことを報告した。しかし、この報告では、供試材料が *M. hupehensis* であっても6年生樹の幼若相と成熟相の部位を比較しているため、初めて花

成が認められる相転換時の植物ホルモン動態は分かっていない。

Zimmerman (1972) は、*M. hupehensis* は樹高 1.8m～2m、主幹節数 75 節～122 節で幼若期から成熟期へ移行することを報告した。また、相転換の時期は樹高よりも節数で判定した方が良く、約 75～80 節位から相転換することを示した。このように、リンゴ実生において相転換に必要な生長量と相転換する節位が示されている。したがって、*M. hupehensis* 実生を用いて、この相転換時の植物ホルモンの変化を明らかにすることができれば、植物生長調節剤により人為的に相転換を誘導し、より確実に早期に相転換させる育苗システムの確立に資することができると考えられる。そこで本章では、*M. hupehensis* 実生において初花成する相転換時の葉における植物ホルモン量の変化を調査した。

実験 1. *M. hupehensis* における相転換と植物ホルモン動態の関係

材料および方法

1) 植物材料

第 1 章において 2019 年に水耕栽培した *M. hupehensis* の中で、生育の比較的揃っている 8 樹を供試した。これらの樹体について、50 節位の葉が完全に展開するまで新梢が伸長した時に、49~51 節位の葉を採取した。次に、70 節位の葉が完全に展開するまで新梢が伸長した時に、69~71 節位の葉を採取した。同様に、89~91 節位の葉および 109~111 節位の葉を採取した。葉の採取時期ごとに、樹高と葉の新鮮重を測定した。インドール酢酸 (IAA)、アブシジン酸 (ABA)、ジベレリン (GAs) の GA₁ および GA₄、サイトカイニン (CKs) のゼアチン (tZ)、ゼアチンリボシド (tZR)、イソペンテニルアデニン (iP) およびイソペンテニルアデノシン (iPA) を分析するまで葉は -20°C で凍結保存した。

2) 各種植物ホルモンの定量

2-1) IAA、ABA、GAs および CKs の抽出および精製

試料に内部標準 (¹³C₆-IAA 10ng、d₆-ABA 80ng、d₂-GA₁ および d₂-GA₄ を各 10ng および d₅-tZ、d₅-tZR、d₆-iP および d₆-iPA を各 10ng) および試料の約 10 倍量の冷 100mg/L ジブチルヒドロキシトルエン含有 80% (v/v) メタノールを加えた後、ホモジナイザーで摩砕抽出して、4°C で一晩置いた。それを吸引ろ過し、ろ液はロータリーエバポレーターで減圧濃縮 (40°C) した。濃縮した試料をリン酸緩衝液 (pH 8.5) で溶解し、50ml 遠心管に移した。溶液にポリビニルピロリドンを加えて、20 分間振とうした。それを 14,000rpm、4°C で 5 分間遠心分離後、吸引ろ過した。ろ液はロータリーエバポレー

ターで減圧濃縮 (40°C) して、蒸留水 (DW) で溶解した。試料を含む水溶液を石油エーテルで3回分配して、石油エーテル相は捨てた。水相をロータリーエバポレーターで減圧濃縮 (40°C) して、1% (v/v) 酢酸で溶解した。それを 1% (v/v) 酢酸含有メタノールおよび 1% (v/v) 酢酸で前処理した Bond Elut LRC-C18 (500mg, Agilent Technologies) カラムに流した。カラムを 1% (v/v) 酢酸で洗浄後、植物ホルモン画分を 1% (v/v) 酢酸含有 80% (v/v) メタノールで溶出した。溶出液はロータリーエバポレーターで減圧濃縮 (40°C) して、1M ギ酸で溶解した。それをメタノールおよび 1M ギ酸で前処理した Oasis MCX (6cc, 150mg, Waters) カラムに流した。1M ギ酸で洗浄後、IAA、ABA および GAs 画分をメタノールで溶出した。その後、0.35M アンモニアで洗浄し、CKs 画分を 0.35M アンモニア含有 60% (v/v) メタノールで溶出した。

IAA、ABA および GAs 画分は、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (40°C) した。濃縮乾固した試料をメタノールで溶解して、メタノールで前処理した Bond Elut LRC-DEA カラム (500mg, Agilent Technologies) に流した。カラムをメタノールで洗浄後、IAA、ABA および GAs 画分を 1% (v/v) 酢酸含有メタノールで溶出した。溶出液はロータリーエバポレーターで減圧濃縮 (40°C) した。濃縮した試料をメタノールに溶解して、スクリーキャップ式マイクロチューブに移した。試料は遠心エバポレーターで濃縮乾固 (40°C) して、-20°Cで凍結保存した。

CKs 画分はロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (40°C) した。濃縮乾固した試料をメタノールに溶解して、スクリーキャップ式マイクロチューブに移して、遠心エバポレーターで濃縮乾固 (40°C) して、-20°Cで凍結保存した。

2-2) 高速液体クロマトグラフによる IAA、ABA および GAs 画分の分取

上記の IAA、ABA および GAs 画分をメタノールに溶解し、フィルター (13mm PTFE、0.22 μ m、AS ONE) でろ過後、N(CH₃)₂-2151-N カラム (6mm \times 150mm、センシユ科学)

を装備した高速液体クロマトグラフ (HPLC) (システムコントローラー SCL-10A、送液ポンプ LC-10ATVP、デガッサー DGU-12A、UV 検出器 SPD-10A、カラムオーブン CTO-10A、クロマトパック C-R6A、フラクションコレクター SF-2120) に注入した。0.1% (v/v) 酢酸含有メタノールを流速 1.5ml/分で流し、カラム温度は 40°C に設定した。保持時間 8~11 分を ABA 画分、保持時間 12~15 分を GAs 画分、保持時間 15~18 分を IAA 画分として分取し、ABA 画分と GAs 画分はひとつにまとめた。それぞれの画分をロータリーエバポレーターで減圧濃縮 (40°C) した。濃縮した試料をメタノールに溶解して、スクリーキャップ式マイクロチューブに移した。試料は遠心エバポレーターで濃縮乾固 (40°C) して、-20°C で凍結保存した。

2-3) LC-MS/MS による植物ホルモンの定量

ABA+GAs 画分は 60 μ L の超純水:0.05% (v/v) 酢酸含有アセトニトリルの混合液 (90:10) に溶解後、ウルトラフリーMC フィルター (Hydrophilic PTFE、0.2 μ m、ミリポア) で遠心ろ過し、ろ液をポリプロピレンプラスチックスクリートップバイアル (300 μ L、Waters) に移した。

CKs 画分は 60 μ L の 0.5% (v/v) 酢酸:0.5% (v/v) 酢酸含有メタノールの混合液 (90:10) に溶解後、ウルトラフリーMC フィルター (Hydrophilic PTFE、0.2 μ m、ミリポア) で遠心ろ過し、ろ液をポリプロピレンプラスチックスクリートップバイアル (300 μ L、Waters) に移した。

これらの試料を VanGuard BEHC18 カラム (2.1mm \times 50mm、Waters) を装備した質量分析計付超高速クロマトグラフィー (UPLC-MS/MS) (Quattro premier XE、Waters) に注入した。ABA および GAs の定量では、流速 0.12ml/分でアセトニトリルと 0.05% (v/v) 酢酸含有アセトニトリルのグラジエントにより溶出した。ABA の保持時間は約 7.2 分、GA₁ および GA₄ の溶出時間は、それぞれ約 4.9 分および約 9.9 分である。CKs の定量で

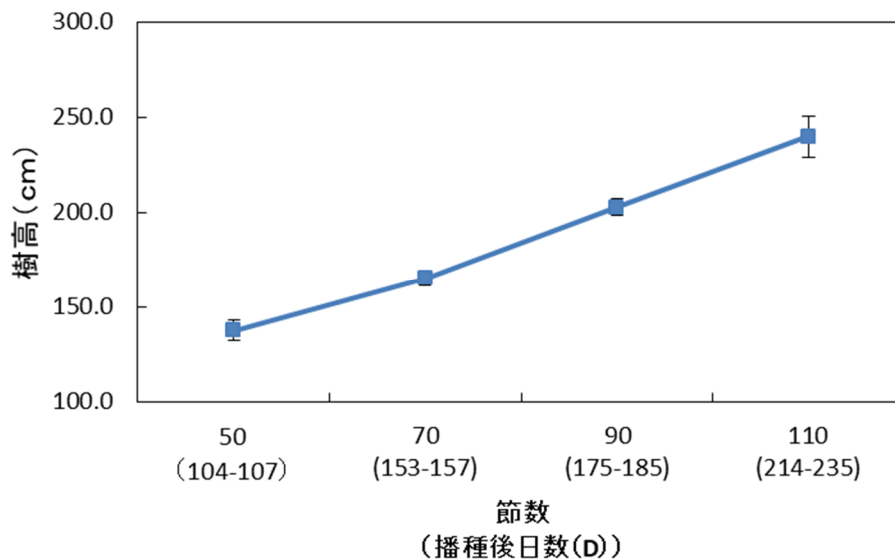
は、流速 0.12ml/分で 0.5% (v/v) 酢酸と 0.5% (v/v) 酢酸含有メタノールのグラジエントにより溶出した。Z、ZR、iP および iPA の溶出時間は、それぞれ約 2.8 分、約 5.0 分、約 5.8 分および約 6.3 分である。

ABA では、d6-ABA の親イオン 269.19 および子イオン 158.99、ABA の親イオン 263.16 および子イオン 152.97、GA₁ では、d2-GA₁ の親イオン 349 および子イオン 275、GA₁ の親イオン 347 および子イオン 273、GA₄ では、d2-GA₄ の親イオン 333 および子イオン 259、GA₄ の親イオン 331 および子イオン 257、tZ では、d5-tZ の親イオン 225.1 および子イオン 136.9、tZ の親イオン 220.1 および子イオン 135.9、tZR では d5-tZR の親イオン 357.2 および子イオン 225、tZR の親イオン 352.2 および子イオン 220、iP では、d6-iP の親イオン 210.1 および子イオン 136.9、iP の親イオン 204.1 および子イオン 135.9、iPA では、d6-iPA の親イオン 342.2 および子イオン 210、iPA の親イオン 336.2 および 204 を選択しモニターした。各植物ホルモン量は内部標準と内生植物ホルモンの面積比により求めた。

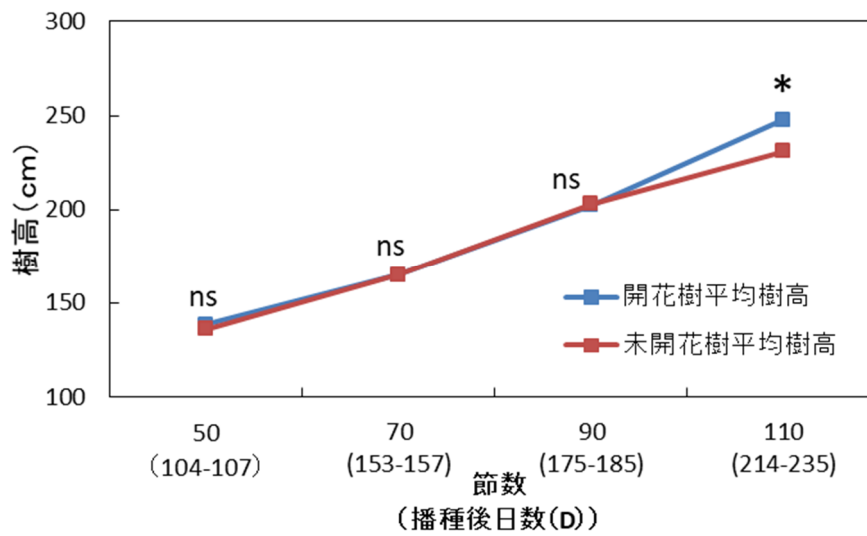
結果

1) *M. hupehensis* 実生の生長および開花

各樹における 50、70、90 および 110 節の葉を採取した日は、それぞれ播種後 104～107 日、153～157 日、175～185 日および 214～235 日であった (第 2.1 図)。50、70、90 および 110 節の葉を採取した時点の 8 樹の平均樹高は、それぞれ 137.4cm、165.1cm、202.8cm および 239.6cm であった。伸長が止まった時点ですべての個体の樹高は 220cm 以上であった。そのうち、4 個体は播種後 10 か月前後で開花した。開花個体および未開花個体の樹高は、50、70 および 90 節の葉を採取した時点までは差はなかったが、110 節の葉を採取した時点の平均樹高は未開花個体よりも開花個体で高かった (第 2.2 図)。開花樹の個体あたり花そう数は 1～8 個であった。また、開花節位ごとの花そう数は、61～80 節では 1 個、81～100 節では 8 個、101～120 節では 4 個であった (第 2.3 図)。



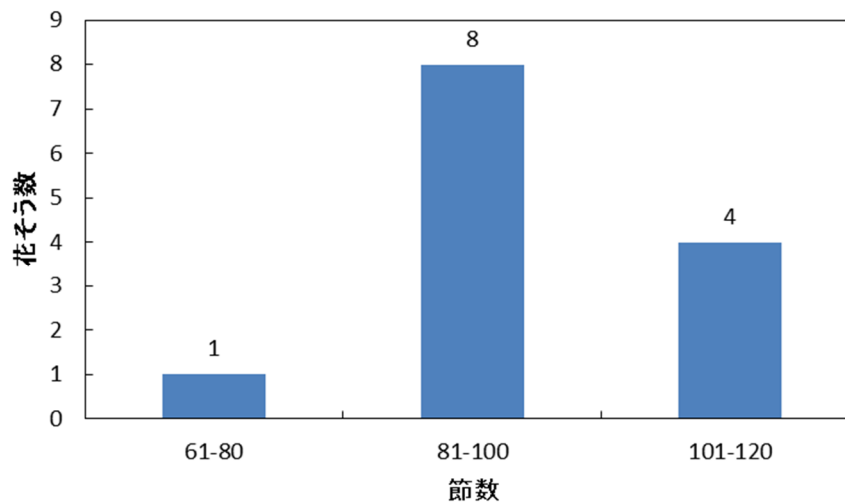
第 2.1 図 葉の採取時の節数と樹高



第 2.2 図 開花樹と未開花樹における葉の採取時の樹高

* : t 検定により 5%水準で有意差のあることを示す

ns : 有意差なし



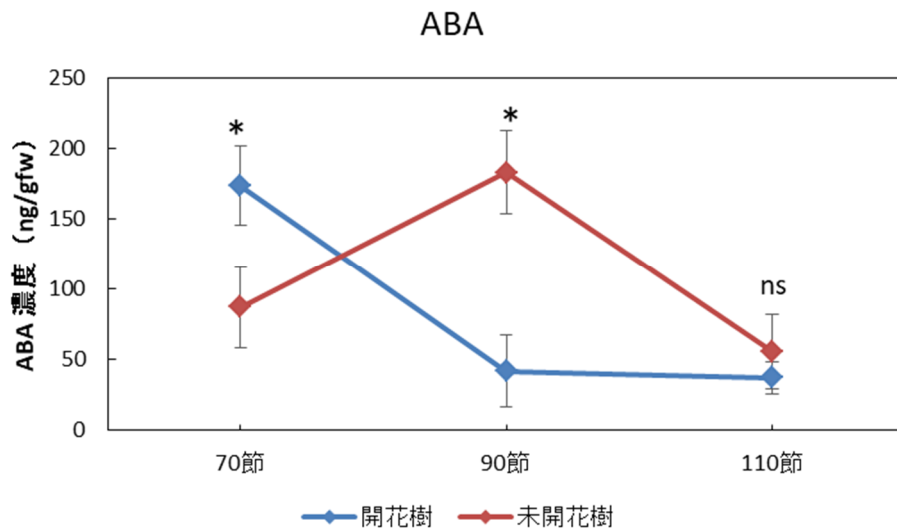
第 2.3 図 開花樹の節範囲別の花そう数

2) *M. hupehensis* 実生の生長と植物ホルモン量の変化

M. hupehensis 実生の開花樹および未開花樹における主幹先端部の成葉中 ABA 濃度を第 2.4 図に示した。開花樹における主幹先端部の成葉中 ABA 濃度は、節数が 70 節まで増加したとき 173.3ng/gfw (以下 gfw は省略) で、節数が 90 節まで増加したとき 41.6ng まで減少し、節数が 110 節まで増加したとき 36.8ng であった。未開花樹における主幹先端部の成葉中 ABA 濃度は、節数が 70 節まで増加したとき 87.1ng で、90 節まで増加したとき 182.9 ng まで増加したが、110 節まで増加したとき 55.7 ng まで減少した。成葉中 ABA 濃度は、70 節では開花樹で未開花樹よりも高く、90 節では未開花樹よりも開花樹で高かった。

M. hupehensis 実生の開花樹および未開花樹における主幹先端部の成葉中 GA₄ 濃度を第 2.5 図に示した。開花樹における主幹先端部の成葉中 GA₄ 濃度は、節位の増加による変化は小さく、70 節、90 節および 110 節まで増加したとき、それぞれ 1.12ng、0.8ng および 1.09ng であった。未開花樹における主幹先端部の成葉中 GA₄ 濃度は、70 節まで増加したとき、および 90 節まで増加したときでは差が小さく、それぞれ 0.86ng および 1.12ng であったが、110 節まで増加したとき 2.43ng まで増加した。

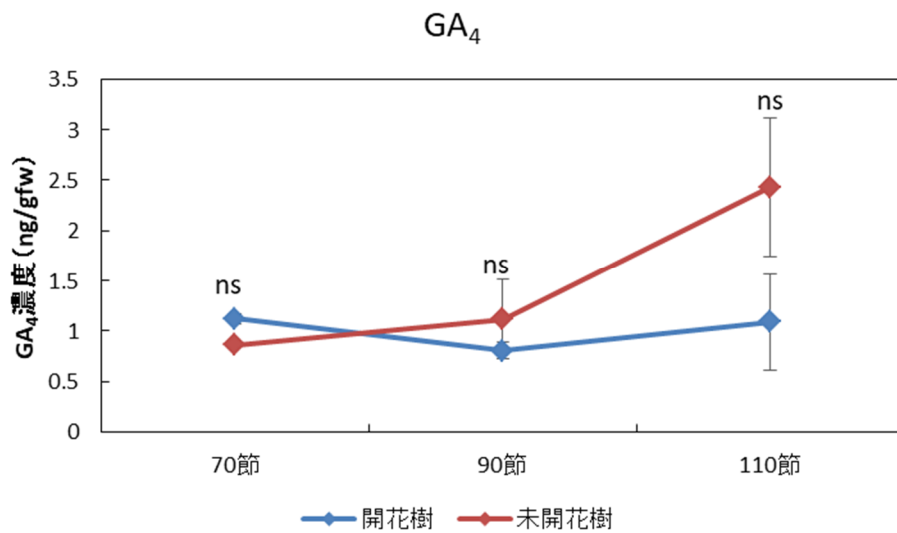
M. hupehensis 実生の開花樹および未開花樹における主幹先端部の成葉中 Z、ZR、iP および iPA 濃度を第 2.6 図に示した。いずれのサイトカイニンも開花樹と未開花樹で差はなく、調査時期による変化も小さかった。



第 2.4 図 開花樹と未開花樹における主幹先端部の成葉中 ABA 含量の変化

*: t 検定により 5%水準で有意差あり

ns: 有意差なし

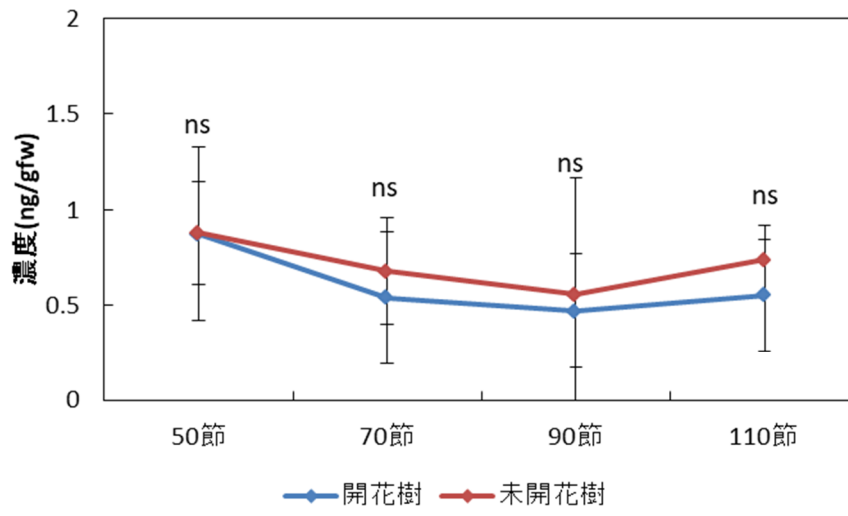


第 2.5 図 開花樹と未開花樹における主幹先端部の成葉中 GA 含量の変化

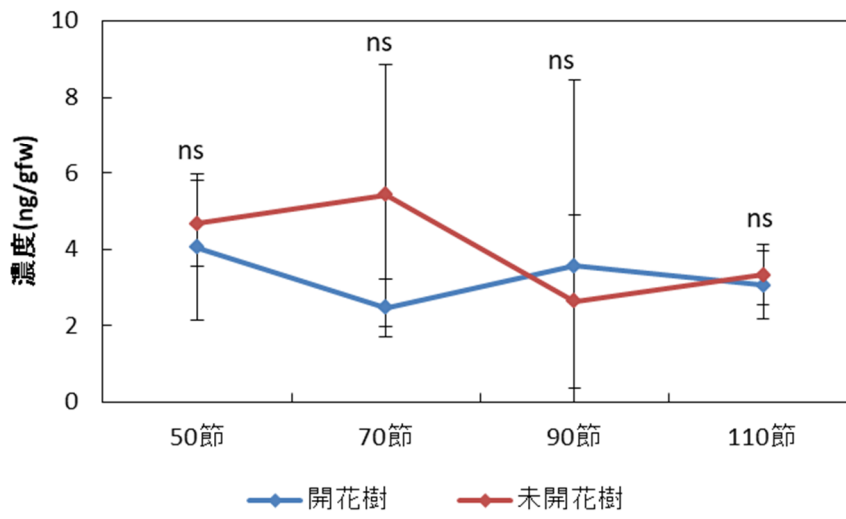
*: t 検定により 5%水準で有意差あり

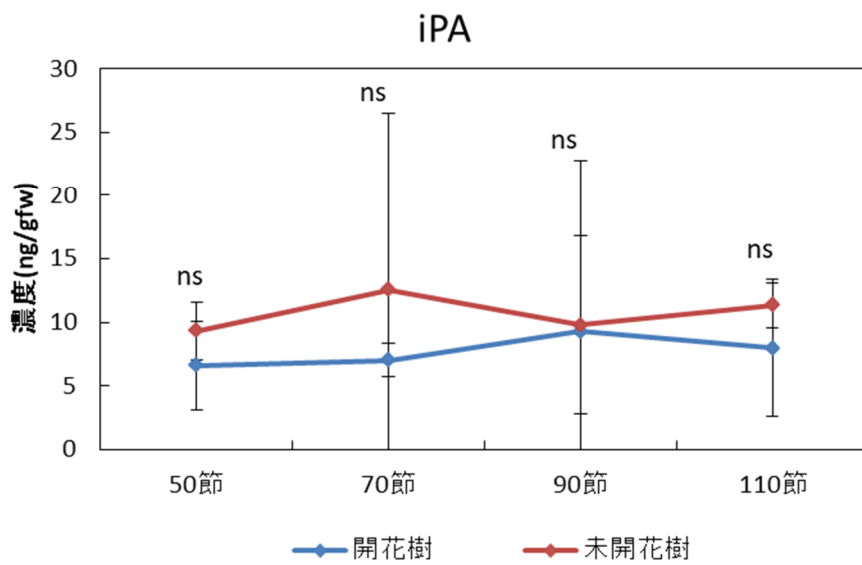
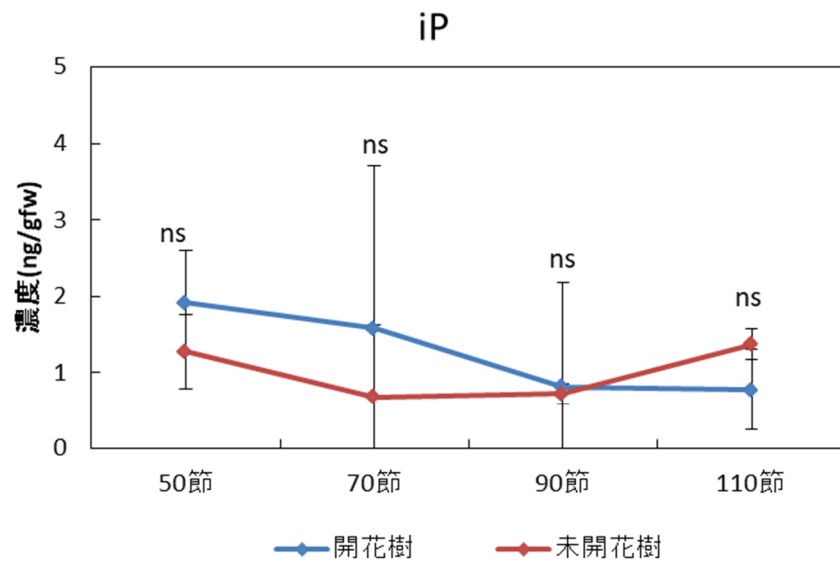
ns: 有意差なし

Z



ZR





第 2.6 図 開花樹と未開花樹における主幹先端部の成葉中 CKs 含量の変化

*: t 検定により 5%水準で有意差あり

ns: 有意差なし

考察

本実験では、*M. hupehensis* 実生が相転換すると予想された主幹の節位とその前後まで生長したときに主幹先端部の成葉を採取し、ABA、GA₄およびサイトカイニン濃度を調査した。供試した *M. hupehensis* 実生 8 個体のうち 4 個体は伸長停止後約 2 か月弱で開花した。したがって、本実験における成葉の採取時期は、相転換期を含んでいたと考えられる。

主幹先端部の成葉中 ABA 濃度は、開花樹および未開花樹のいずれでも節位の増加により大きく変化した。主幹の節位が 70 から 90 節まで増加したとき、成葉中 ABA 濃度は開花樹では減少したが、未開花樹では増加した。*M. hupehensis* 実生は、樹高 200cm 以上で相転換することが知られている (Zimmerman, 1971)。本実験では、主幹の節位が 90 節まで増加したとき、樹高が約 200cm であった。したがって、開花樹において主幹の節位が 70 から 90 節まで増加したときの主幹先端部の成葉中 ABA 濃度の減少は、相転換と関係していることが示唆された。6 年生 *M. hupehensis* 実生の葉におけるアブジン酸濃度は、3~5 月は幼若相よりも成熟相の葉で高く、7 および 8 月では成熟相よりも幼若相の葉で高い (Xing et al., 2014)。本試験でも、主幹の節位が 70 節まで増加したとき、成葉中の ABA 濃度は開花樹で未開花樹よりも高かったが、90 節まで増加したとき、成葉中の ABA 濃度は逆転した。このことから、主幹の節位が 70 節まで増加したときの成葉中の ABA 濃度も相転換と関係しているのかもしれない。その場合、樹高 170cm 程度の時点で、相転換する個体としない個体がすでに決まっていたことになる。この点については、他の植物ホルモンの変化も含め、さらに検討が必要である。また、未開花樹では、開花樹よりも遅れて主幹の節位が 90 から 110 節まで増加したときに主幹先端部の成葉中 ABA 濃度が減少した。したがって、本試験において、未開花樹でも主幹を 130 節以上まで増加させることができれば、開花樹よりも遅れて相転換し、開花した可能性がある。以上の結果から、リンゴ実生への ABA 合成阻害剤の散布処理により、相

転換を早期化および安定化させることができるかもしれない。

主幹先端部の成葉中 GA₄ 濃度は、開花樹では節位が増加してもほとんど変化はなかった。未開花樹の成葉中 GA₄ 濃度も主幹の節位が 70 および 90 節では開花樹と差がなかったが、主幹の節位が 110 節になったとき、成葉中 GA₄ 濃度が増加し、開花樹より高い傾向がみられた。主幹の節位が 110 節になったときの開花樹の樹高は未開花樹よりも高かった。一般にジベレリンは新梢生長を促進する作用を持つ (Cline, 1994)。しかし、本試験では主幹の節位が 110 節になったとき、開花樹の GA₄ 濃度は未開花樹より低かった。この樹高と GA₄ 濃度の相反する原因は不明である。6 年生 *M. hupehensis* 実生の葉におけるジベレリン濃度は、4 および 5 月は成熟相よりも幼若相の葉で高い (Xing et al., 2014)。また、ジベレリン合成阻害剤の SADH はリンゴ実生の開花を早める (Zimmerman, 1971) とされている。これらの結果と同様に、本試験においても GA₄ 濃度が低いことは相転換と関係することが推察された。しかし、本試験では主幹の節位が 110 節になったとき、開花樹の GA₄ 濃度が未開花樹よりも低かったことは開花樹の GA₄ 濃度が減少したのではなく、未開花樹の GA₄ 濃度が増加した結果であると考えられる。なお主幹の節位が 110 節になったとき未開花樹の GA₄ 濃度が増加した理由は不明である。

‘紅玉’ × ‘Golden Delicious’ の 2 年生実生では、相転換すると想定される節の前後に、樹皮において活性型サイトカイニンの Z 濃度が増加し、葉において不活性型サイトカイニンのジヒドロゼアチンリボシド (DHZR) が減少した (Zhang et al., 2008)。6 年生 *M. hupehensis* 実生の葉におけるサイトカイニン濃度 (サイトカイニンの種類は不明) は、幼若相と成熟相の両方において 3 月から 8 月まで減少し、3 月から 6 月までのサイトカイニン濃度は幼若相の葉よりも成熟相の葉で高かった (Xing et al., 2014)。これらの報告から、リンゴ実生の相転換にサイトカイニン濃度の増加が関与していると考えられる。しかし、本研究では、いずれのサイトカイニンの濃度も開花樹と未開花樹の間で差はなかった。Zhang et al. (2008) は、2 年生リンゴ実生を春季から栽培し、9 月下旬

にサイトカイニン分析のため実生の基部から先端まで5節ずつ葉を採取しているが、どの節でいつ相転換していたのかについては確認していない。また、Xing et al. (2014)の報告は、6年生樹を供試しており、初開花した相転換時期と植物ホルモンの関係を示したものではない。一方、本研究では、播種後約10~12か月で初開花した個体を供試した。また、個体ごとの開花節位も把握しており、葉の採取時には相転換期が含まれていたと推定される。したがって、これまでの報告と比べて、リンゴ実生の初開花した相転換期の植物ホルモン動態をより正確に把握できたと考えられる。したがって、リンゴ実生の相転換へのサイトカイニンの関与は小さいものと考えられる。

III. リンゴにおける花芽分化特性の解明

緒言

成熟相にあるリンゴは、自然環境下における通常の栽培条件では6月頃に新梢伸長が停止後、花芽分化が開始し、花芽は落葉期まで発達する。その後長い休眠を経て、翌春に開花する。もし自在に花成・開花を制御できるようになれば、育種における1世代に要する時間の短縮だけでなく、花成・開花・果実肥大の研究を季節に関わらず実施できるようになる。花芽分化から開花までの期間を短縮するためには、休眠を省略することがその手段の一つである (Janick, 1974 ; 湯田ら, 1981)。そのためには、花芽分化・発育と休眠に関わる生理機構を十分に解明する必要がある。花芽の形成は、植物ホルモンの影響される (Buban, 1996)。植物ホルモンのうちジベレリン (GA) と花芽分化の関係が最も多く研究されており、リンゴやナシの隔年結果に影響を及ぼすことが報告されている (伴野ら, 1985 ; Guardiola et al., 1982; Ito et al., 1999; Luckwill, 1974, 1979; Lenz and Karnatz, 1973)。リンゴにおいて開花後4~6週に、新梢の先端から基部へのIAA輸送、すなわち新梢先端部のIAAの減少は、花成に重要な役割を果たす可能性がある (Hoad, 1983 ; Callejas and Banerth, 1997)。また、新梢伸長の停止は花芽分化開始のために必要条件である。アブシジン酸 (ABA) は新梢の栄養生長の停止を促進する作用があるため、伸長停止前のABAは間接的に花芽分化に影響を与えられ (Rakngan et al., 1995)。

これまでの試験に用いられてきた品種では、枝により花芽着生の有無、分化時期が大きく異なるため、本研究では花芽の着生が非常に良く、規則的である‘Snowdrift’を用いて、同じ時期に伸長停止した枝の花芽分化・発育および休眠と植物ホルモンの関係を解析した。また、‘Snowdrift’における花芽分化の限界時期を把握するため、発育期間中に当年枝をすべて除去する処理を2週間間隔で行い、そこから発生した新梢の翌年の開

花を調査した。

実験1 ‘Snowdrift’における花芽分化と休眠および植物ホルモンとの関係

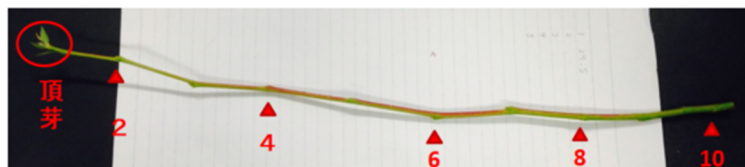
材料および方法

1) 供試材料

2018年に岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター滝沢農場に植栽されている10年生‘Snowdrift’（マルバカイドウ台木）2樹を供試した。新梢伸長停止期の揃った枝を採取するため、あらかじめラベルした新梢の長さを毎週計測した。その結果、6月12日に伸長停止した新梢数が多かったため、この時期に伸長停止した新梢を供試材料とした。

2) 花芽分化ステージの調査

前述の6月12日に伸長停止した新梢から、新梢伸長停止1週間後（6月20日）、2週間後（6月28日）、4週間後（7月13日）、6週間後（7月25日）および8週間後（8月7日）の計5回、各5枝を採取した。新梢長は21.3～35.1cm、平均新梢長は27.8cmであった。新梢の頂芽、上から2番目の腋芽、上から4番目の腋芽、上から6番目の腋芽、上から8番目の腋芽および上から10番目の腋芽を採取し（第3.1.1図）、パラフィン切片を作製するためにFAAで固定した。



第3.1.1図 花芽分化採取様式

2-1) 試料の固定

試料の 10 倍量以上の FAA を容器に注ぎ、試料を浸漬して、30min 脱気した。また新しい FAA に浸漬後、30min 脱気する操作を 3 回繰り返した。その後、蓋をして半日以上静置した。

2-2) 水洗

水道水を入れたビーカーに試料を移し、振とう器で攪拌した。1 時間ごとに水道水を入れ替える操作を 5 回繰り返した。

2-3) 脱水

1. 50%EtOH を入れた別の容器に試料を移す (半日)
2. 70%EtOH (半日) (一晩静置可能)
3. 85%EtOH (半日)
4. 80%EtOH+n-Buthanol=65ml+35ml (半日)
5. 90%EtOH+n-Buthanol=45ml+55ml (半日)
6. 無水 EtOH+n-Buthanol=25ml+75ml (半日)
7. n-Buthanol (室温, 半日)
8. n-Buthanol (室温, 半日)

2-4) パラフィン置換

1. パラフィン溶融器に静置 (56°C, 半日)
2. 容器に n-Buthanol の 1/4 量の固形パラフィンを入れる (半日)
3. 容器に n-Buthanol の 1/4 量の固形パラフィンを入れる (半日)
4. 混合液を捨て、溶融パラフィンに交換 (一晩)
5. 溶融パラフィンに交換 (半日)

6. 溶融パラフィンに交換 (半日)
7. 溶融パラフィンに交換 (半日)
8. 溶融パラフィンに交換 (半日)
9. 溶融器内に 3 日間静置

2-5) 切片作成

回転式マイクロトームで切片を作成し、スライドガラスに切片を貼り付けた。

2-6) パラフィン溶除

1. レモゾール 10min (25°C)
2. レモゾール 10min (25°C)
3. 無水 EtOH 2min
4. 無水 EtOH 2min
5. 95%EtOH 2min
6. 85%EtOH 2min
7. 50%EtOH 2min
8. 水洗 3~5min

2-7) 染色・封入

1. ヘマトキシリン 5min
2. 水洗 5~10min
3. 50%EtOH 2min
4. 75%EtOH 2min
5. 95%EtOH 2min

6. 無水 EtOH 2min
7. 無水 EtOH 2min
8. レモゾール : EtOH=1 : 1 5min
9. レモゾール 10min～
10. カナダバルサムで封入

2-8) 花芽分化ステージの観察

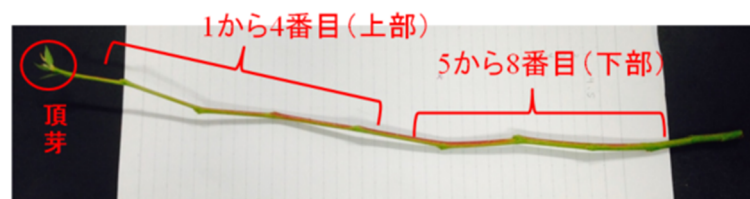
染色後プレパラートを光学顕微鏡で観察した。長内ら（1990）の定義に従って、花芽分化ステージを（1）未分化期、（2）分化初期、（3）分裂組織肥大期、（4）花器原基発達期①、（5）花器原基発達期②、（6）花器初生突起期および（7）がく片形成期に区分した。

3) 休眠特性調査

前述の6月12日に伸長停止した新梢から、停止1週間後(6月20日)、2週間後(6月28日)、4週間後(7月13日)、6週間後(7月25日)および8週間後(8月7日)に新梢を採取した。各時期に7枝を採取した。それらの枝の長さは26.2~40.6cm、平均長さは31.7cmであった。新梢の休眠状態を調べるため水挿し試験を行った。頂芽から基部に向かって7番目の芽までを調査の対象とした。水と新梢の腐敗を防ぐために次亜塩素酸ナトリウム水溶液(6%次亜塩素酸ナトリウム、花王キッチンハイター)を2,000倍希釈になるように添加した。水挿しした新梢は25℃、蛍光灯24時間照射の条件下においた。3日おきに水を交換し、新梢基部を水切りした。新梢の採取日から60日間、毎日萌芽を調査し、萌芽日を記録した。鱗片から生長した葉の長さが鱗片と同じ長さになったときを萌芽と定義した。

4) 植物ホルモンの動態

6月12日に伸長停止した新梢から、新梢伸長停止1週間後(6月20日)、2週間後(6月28日)、4週間後(7月13日)、6週間後(7月25日)および8週間後(8月7日)に80枝を採取した。それらの新梢長は16.1~48.9cm、平均新梢長は29.8cmであった。新梢の芽を、(1)頂芽、(2)先端から1~4番目の腋芽、(3)先端から5~8番目の腋芽とした(第3.1.2図)。植物ホルモンの抽出、精製および定量は、II. リンゴ実生の相転換に関する内生植物ホルモン動態の解析と同様に行った。

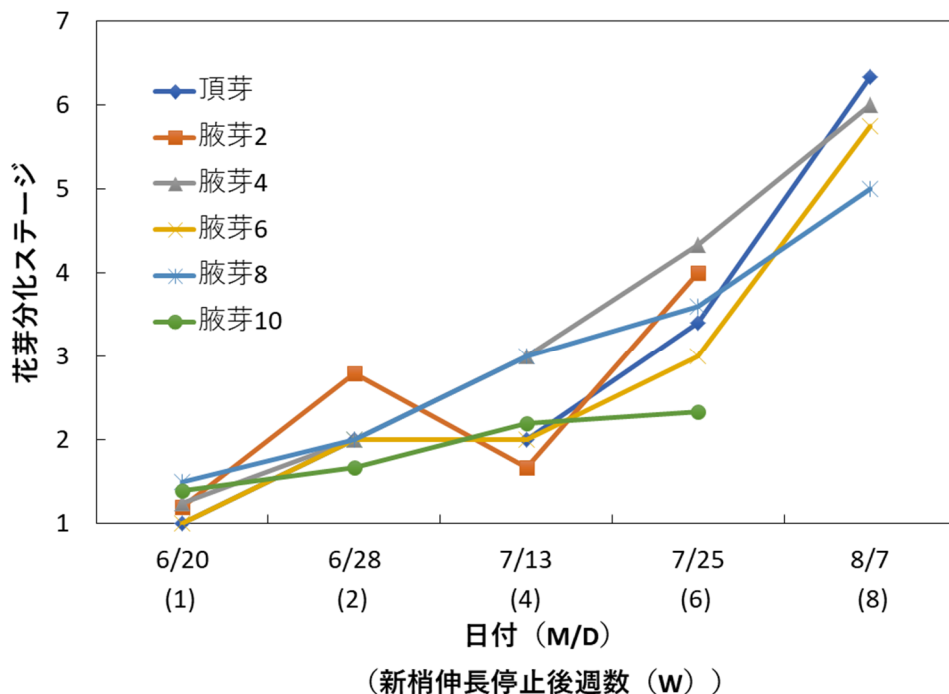


第3.1.2図 植物ホルモン分析における芽の区分

結果

1) 花芽分化ステージ

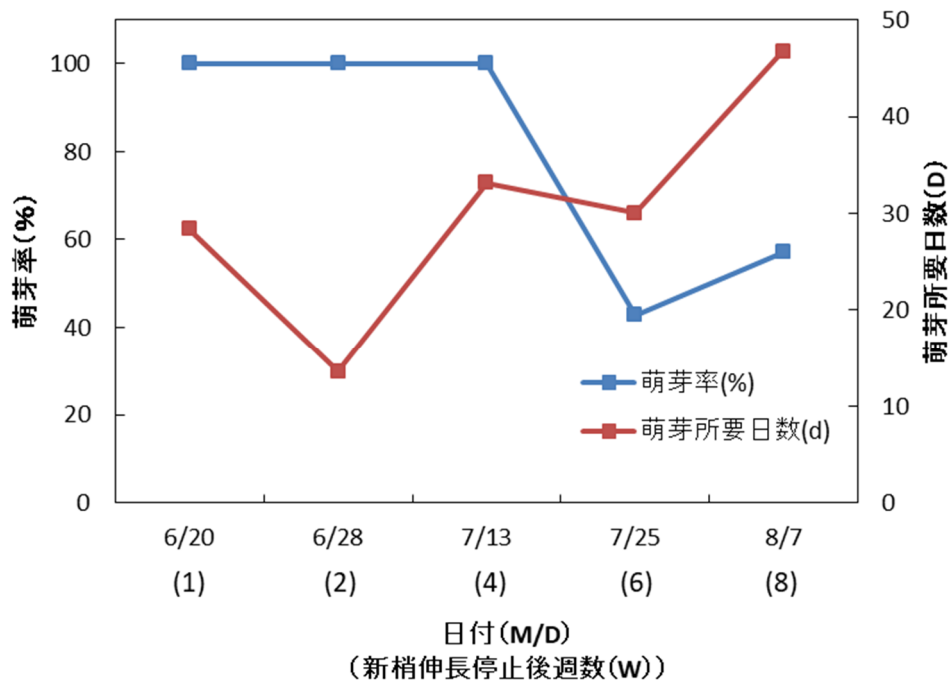
新梢伸長停止 1 週後では、頂芽と腋芽 6 は (1) 未分化期で、その他の部位の芽は (1) 未分化期と (2) 分化初期の間であった (第 3.1.3 図)。新梢伸長停止 2 週後では、本試験で最も低い位置に着生している腋芽 10 以外の芽は (2) 分化初期に入った。腋芽 2 では、(2) 分化初期と (3) 分裂組織肥大期の間であった。新梢伸長停止 4 週後では、腋芽 4 および腋芽 8 は (3) 分裂組織肥大期に入り、腋芽 10 は (2) 分化初期であった。新梢伸長停止 6 週後では、頂芽および腋芽 6 は (3) 分裂組織肥大期に入り、腋芽 2 および腋芽 4 は (4) 花器原基発達期①に入っていた。新梢伸長停止 8 週後では、頂芽および腋芽 4 は (6) 花器初生突起期に入り、腋芽 6 および腋芽 8 は (5) 花器原基発達期②に入っていた。



第 3.1.3 図 新梢伸長停止 1、2、4、6 および 8 週後の花芽分化ステージ

2) 休眠調査

新梢伸長停止 1、2、4、6 および 8 週後の萌芽率はそれぞれ 100%、100%、100%、42.9% および 57.1% で、萌芽所要日数はそれぞれ 28.4、13.6、33.1、30.0 および 46.8 日であった。萌芽した部位はすべて頂芽あるいは腋芽上部であった。萌芽率は新梢伸長停止 1~4 週後では 100% であり、6 週後に 50% 以下まで減少したが、8 週後にはやや増加した（第 3.1.4 図）。萌芽所要日数は、新梢伸長停止 1 から 2 週後にかけて減少し、4 週後まで増加した。その後、萌芽所要日数は 6 週後まで横ばいで、8 週後には 46.8 日まで増加した。これらの結果から、新梢は伸長停止 6 週後に自発休眠導入期に入ったと推定された。新梢伸長停止 8 週後に採取した枝は、水挿し 61 日後に 7 本中 1 本の 3 番目の腋芽で開花が認められた（第 3.1.5 図）。



第 3.1.4 図 新梢伸長停止後の新梢の休眠状態の変化



第 3.1.5 図 新梢伸長停止 8 週後に採取した枝における開花状況

3) 植物ホルモンの動態

3-1) ABA

頂芽および腋芽上部の ABA 濃度は、新梢伸長停止 1 から 8 週後まで減少する傾向がみられた(第 3.1.6 図)。頂芽の ABA 濃度は、新梢伸長停止 1 週後で最も高く 16971.5ng/gfw (以下、ng)であった。新梢伸長停止 2、4、6 および 8 週後に、頂芽の ABA 濃度はそれぞれ 10678.6ng、8848.2ng、7766.3ng および 6289.8ng と次第に減少した。とくに、新梢伸長停止 1 から 2 週後にかけて大きく減少した。腋芽上部の ABA 濃度は頂芽よりも低く推移した。新梢伸長停止 1、2、4、6 および 8 週後の、腋芽上部の ABA 濃度はそれぞれ 7593.5ng、6199.1ng、3622.3ng、3526.8ng および 2174.5ng で次第に減少した。腋芽下部の ABA 濃度は腋芽上部とほとんど差はなかったが、3263.0~7547.2ng の範囲で採取時期により増減した。

3-2) GA₄

GA₄濃度は、腋芽上部および腋芽下部より頂芽で高く推移した(第 3.1.7 図)。頂芽の GA₄濃度は新梢伸長停止 1 週後で 15.74ng と最も高く、新梢伸長停止 6 週後には 4.76ng まで減少した。その後、新梢伸長停止 8 週後にはやや増加した。腋芽上部と腋芽下部の GA₄濃度もほぼ同様に推移した。腋芽上部および腋芽下部の GA₄濃度はいずれも新梢伸長停止 1 週後で最も高く、それぞれ 6.76ng および 4.53ng であった。新梢伸長停止 4 週後の腋芽上部および腋芽下部の GA₄濃度は、それぞれ 2.31ng および 1.64ng にまで減少した。これらは新梢伸長停止 8 週後まで横ばいで推移した。

3-3) CKs

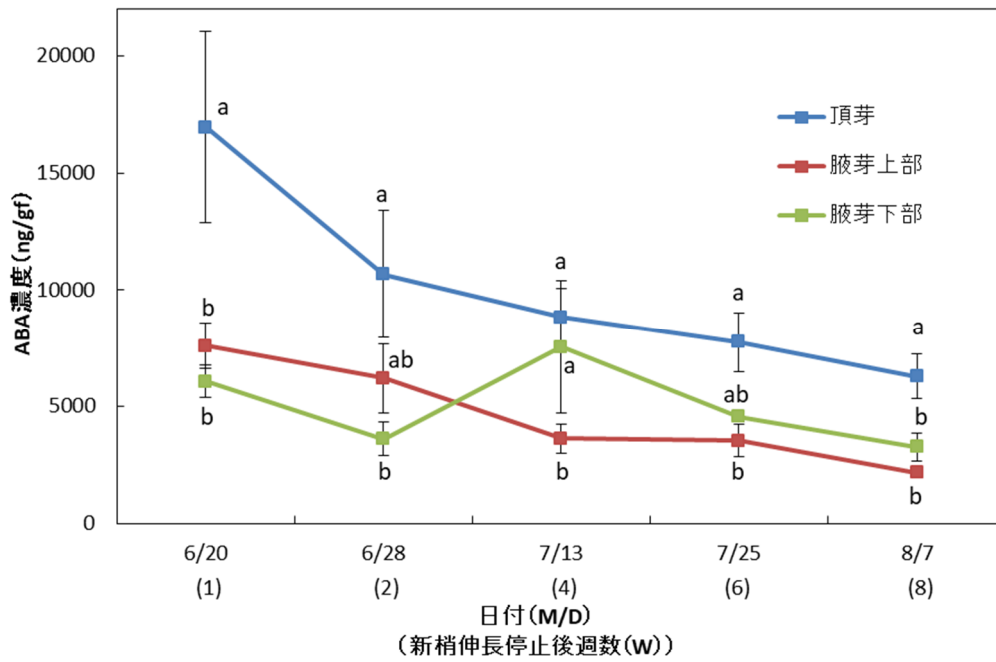
頂芽の Z 濃度は新梢伸長停止 2 週後で 3.24ng であり、4 週後に 9.60ng まで増加し、6 週後の 10.16ng から 8 週後の 2.20ng まで減少した。腋芽上部の Z 濃度は新梢伸長停止 1

週後の 2.90ng から 4 週後の 7.93ng まで増加し、その後、8 週後には 1.95ng まで減少した (第 3.1.6 図)。腋芽下部の Z 濃度は調査期間中ほとんど変化せず、2.31~3.51ng の範囲であった。新梢伸長停止 6 週後の Z 濃度は、頂芽では 10.16ng で、腋芽上部の 3.07ng および腋芽下部の 2.45ng より高かった (第 3.1.8 図)。

頂芽および腋芽上部の ZR 濃度は、新梢伸長停止 1 週後から 4 週後まで減少し、6 週後にかけて増加後、8 週後には再び減少した。腋芽下部の ZR 濃度は、新梢伸長停止 1 週後の 8.16ng から 8 週後の 2.94ng まで減少傾向にあった。新梢伸長停止 8 週後の ZR 濃度は頂芽では 5.01ng であり、腋芽上部の 2.75ng および腋芽下部の 2.94ng より高かった (第 3.1.8 図)。

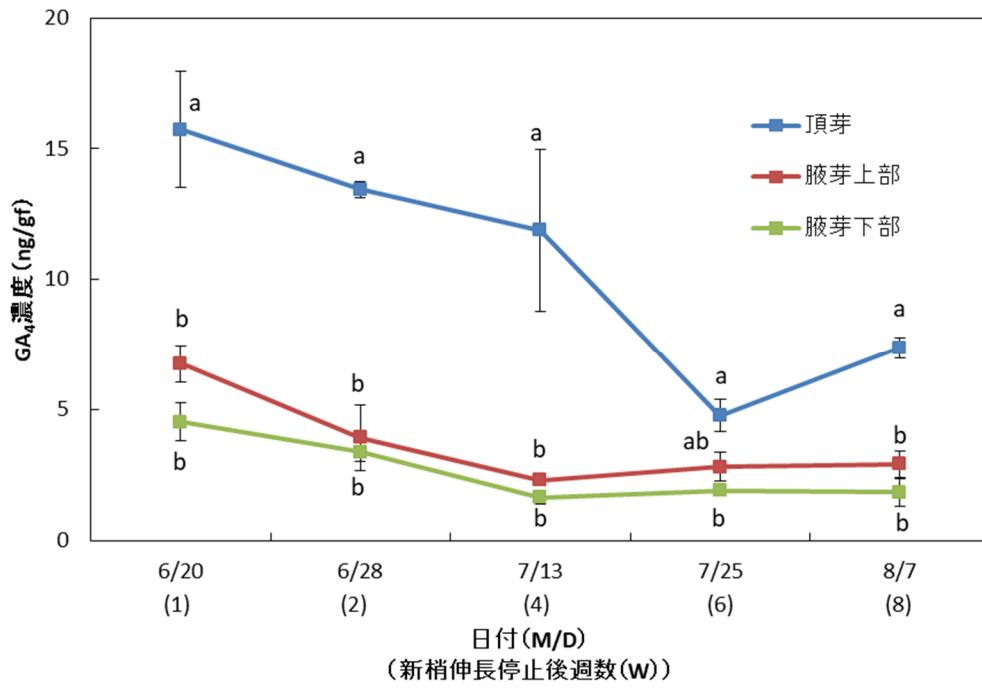
新梢伸長停止 1 週後における iPA 濃度は腋芽上部の 21.49ng が最も高く、次に腋芽下部の 13.71ng、頂芽の 6.06ng の順であった。頂芽の iPA 濃度は新梢伸長停止 1 週後の 6.06ng から 6 週後の 30.88ng まで増加し、8 週後にかけて 21.50ng まで減少した。腋芽上部および腋芽下部の iPA 濃度は新梢伸長停止 2 週後までやや減少し、その後、新梢伸長停止 8 週後まで変化は小さかった。新梢伸長停止 6 週後および 8 週後の頂芽の iPA 濃度は腋芽上部および腋芽下部より高かった (第 3.1.9 図)。

頂芽の iP 濃度は、新梢伸長停止 1 週後の 22.55ng から 8 週後の 4.99ng まで減少傾向にあった。腋芽上部および腋芽下部の iP 濃度は、調査期間中の変化は小さく、2.54~9.68ng の範囲で、頂芽より低く推移する傾向がみられた (第 3.1.9 図)。



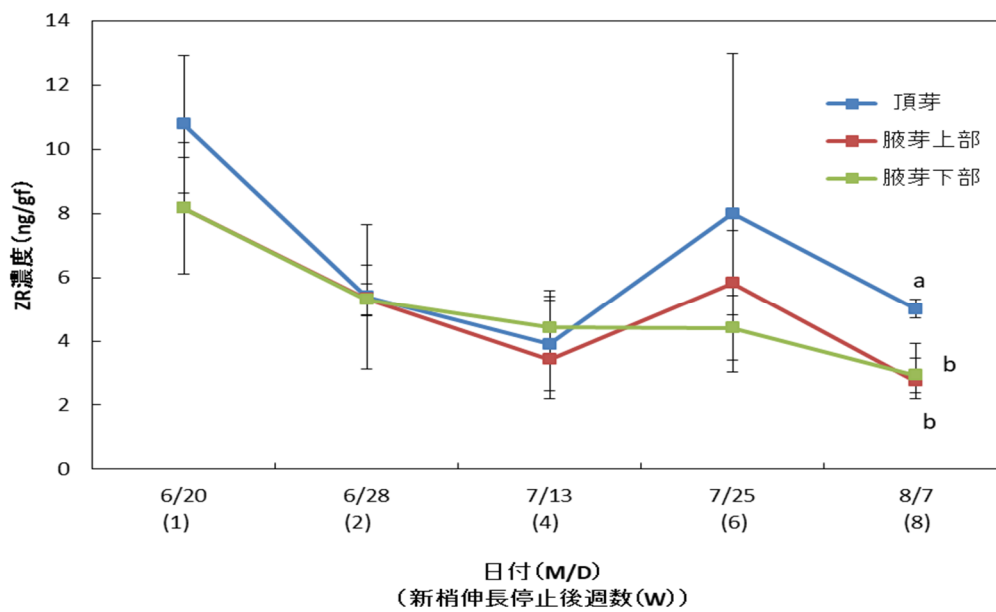
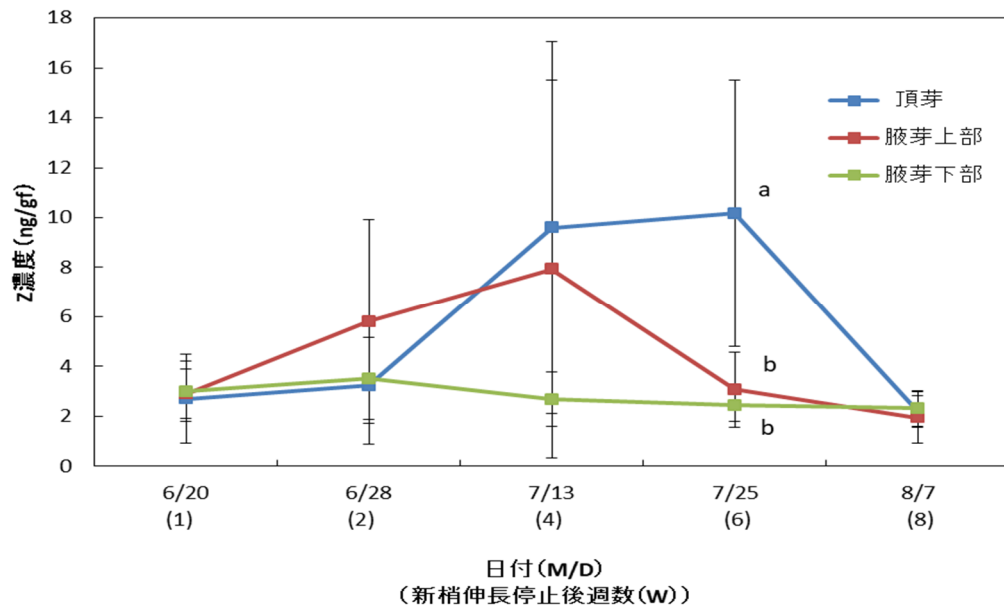
第 3.1.6 図 新梢伸長停止後の新梢の各芽における ABA 濃度の変化

異なる英小文字間に Tukey-HSD 検定により 5%水準で有意差のあることを示す



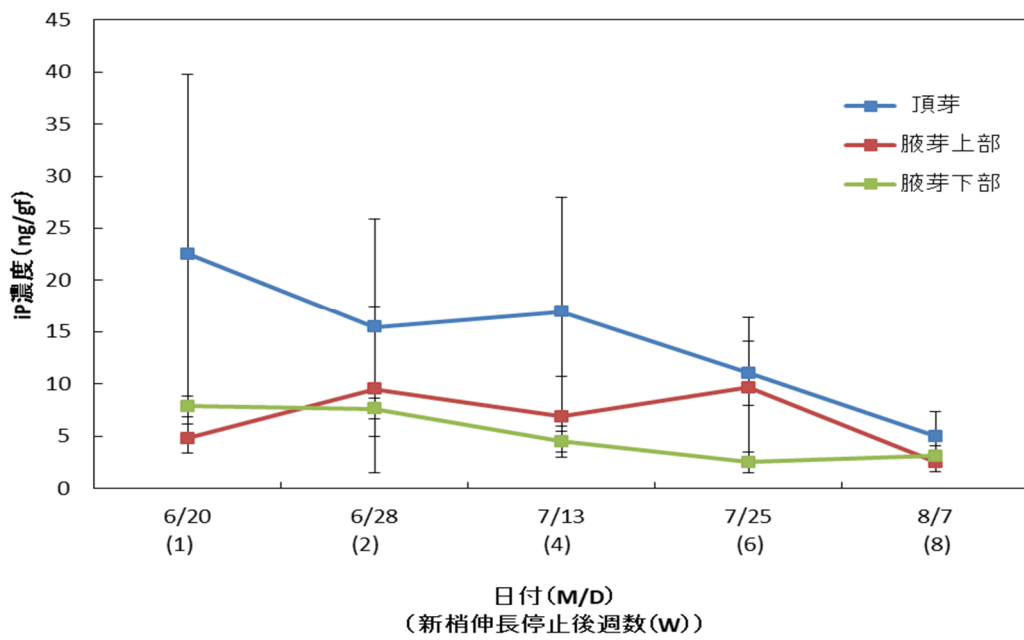
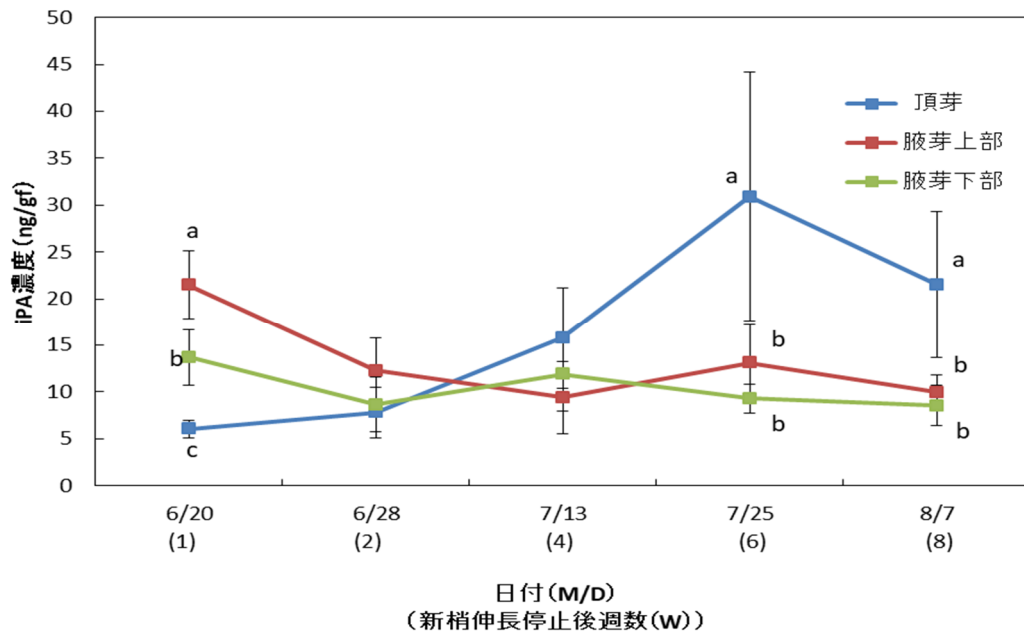
第 3.1.7 図 新梢伸長停止後の新梢の各芽における GA₄ 濃度の変化

異なる英小文字間に Tukey-HSD 検定により 5%水準で有意差のあることを示す



第 3.1.8 図 新梢伸長停止後の新梢の各芽における Z、ZR 濃度の変化

異なる英小文字間に Tukey-HSD 検定により 5%水準で有意差のあることを示す



第 3.1.9 図 新梢伸長停止後の新梢の各芽における iP、iPA 濃度の変化

異なる英小文字間に Tukey-HSD 検定により 5%水準で有意差のあることを示す

考察

花芽分化は新梢伸長停止 2 週後から開始した。芽の部位ごとの花芽分化の順序について、リンゴでは頂芽の花芽分化開始は腋芽よりも早いという報告 (Magness, 1916; Gibbs and Swarbrick, 1930) もある一方、リンゴの花芽分化は新梢の中央から始まるとする報告 (Buban・Faust, 1982) もある。渡邊ら (2018) は、‘Snowdrift’を用いて伸長停止期の異なる新梢における芽の部位ごとの花芽発育を調査し、伸長停止 6 週後では伸長停止期の遅い新梢では頂芽よりも上部の腋芽の花芽発育が早いことを示した。本実験でも、新梢伸長停止 6 週後における芽の部位ごとの花芽分化ステージを比較すると、頂芽よりも腋芽 2 および腋芽 4 の花芽ステージが進んでおり、渡邊ら (2018) と同様の傾向がみられた。しかし、新梢伸長停止 8 週後の花芽分化ステージは新梢先端部でより進行していた。

水挿し実験の結果から、‘Snowdrift’は新梢伸長停止 6 週後に自発休眠の導入期に入ったことが推測された。水差し試験中に開花した 3 番目の腋芽 3 では、新梢を採取した新梢伸長停止 8 週後 (8 月 7 日) 時点ですでに自発休眠期に入っており、花芽分化は (6) 花器初生突起期であったと推定される (腋芽 4 を基準とする)。その後、水挿しにより、花芽が萌芽し開花したと考えられる。水挿し試験の開始時点 (新梢伸長停止 8 週後) では、いずれの芽においても ABA と GA₄ 濃度は低かった。したがって、花芽分化後も芽の植物ホルモンを低 ABA および低 GA₄ 濃度に維持することができれば、花芽分化後の休眠を省略して、開花誘導させることができると考えられた。また、同時期の Z および iP 濃度も低かった。条件的休眠期にある新梢に対して BA 散布を行うと萌芽が誘導されることから (Watanabe et al., 2018)、開花を誘導するためにはサイトカイニン濃度を増加させる必要がある。

ニホンナシにおいて、高濃度の ABA 処理は新梢の栄養生長を抑制し、間接的に花成を促進する (Rakngan et al., 1995)。本実験でも、新梢伸長停止 1 週後の頂芽における

ABA 濃度が高かったのは伸長停止直後であったためと考えられる。新梢伸長停止 1 週後ではまだ形態的な花芽分化は進行していないが、高濃度の ABA が間接的にその後の花芽分化の進行に影響を与えたことが推察された。伴野ら (1985) は、ニホンナシにおいて腋芽が着きやすいニホンナシ‘豊水’の腋芽中の ABA 濃度は、腋芽の着きにくい‘新水’よりも低いことを報告している。一方、Ito et al. (1999) は、ニホンナシ‘幸水’の新梢を誘引すると腋芽の花芽が増加するが、同時に腋芽中の ABA 濃度が増加することを示した。このように ABA の花芽分化に対する影響は判然としていない。本実験では、新梢停止 2 週後以降、芽の ABA 濃度の減少に伴って花芽分化ステージが進行したが、芽の部位ごとの ABA 濃度と花芽分化ステージの進行との間に顕著な関係はなく、‘Snowdrift’の花芽分化と ABA との関係は明らかではなかった。

一般に GAs は果樹の花芽形成を抑制することが知られている (Bertelsen ら, 2002 ; McArthey SJ ら, 1998 ; Tromp, 1982)。リンゴの新梢に対する GA₄ 処理は花成に影響しないとする報告もあれば (McArthey et al., 1998)、GA₄ は花成を促進したが、その効果には年次間差があるとする報告もある (Greene, 1993)。本実験では、いずれの部位の芽でも新梢伸長停止 1 週後に GA₄ 濃度が最も高かったが、その後新梢伸長停止 4 週後まで GA₄ 濃度は減少した。すなわち、‘Snowdrift’でも芽中の GA₄ 濃度の減少は花成を促進することが示唆された。しかし、ABA 濃度と同様に、GA₄ 濃度についても芽の部位ごとの花芽ステージとの関係が認められなかった。

ニホンナシの新梢を水平に誘引すると腋芽の花芽分化が促進され、このとき、腋芽の Z および ZR 濃度が増加する (Ito et al., 1999)。また、ニホンナシの腋芽の花芽数を増加させる抗オーキシン剤のマレイン酸ヒドラジッド (MH) の散布処理は、腋芽の Z、ZR および iP 濃度を増加させ、iPA 濃度を減少させる (伊東ら, 2001)。さらに、ニホンナシの花芽分化期における新梢への BA 散布処理は、新梢あたりの花芽数を増加させる (Ito et al., 2000)。リンゴでも花芽分化期の短果枝に対するサイトカイニン処理は翌年

の開花数を増加させた (Ramirez et al., 2004)。このように、サイトカイニンが、リンゴ、ナシなど多くの果樹で花芽分化を促進することは疑いない事実である。しかし、本研究では、いずれの部位の芽の花芽分化も同様に進行したが、Z、ZR、iP および iPA 濃度の変化は芽の部位ごとに異なっていたため、花芽分化とサイトカイニン濃度との間に一定の関係はみられなかった。

実験2 ‘Snowdrift’における花芽分化限界時期の把握

材料および方法

1) 供試材料

2013、2014、2018 および 2019 年に岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター滝沢農場に植栽されている ‘Snowdrift’を供試した。2013 および 2014 年に 2 棟のビニールハウス内 (3m×10m) で栽培している 4 年生 (2013 年当時) ‘Snowdrift’ (マルバカイドウ台木) 18 樹 (各棟 9 樹) を使用した。1 棟を自然日長の無補光で、もう 1 棟を補光による 15 時間日長で管理した。15 時間日長の補光区は 5 : 30 から 19 : 30 まで 660w の高圧ナトリウムランプ (NH660FLS、岩崎電気) で補光した。補光期間は 2013 年 6 月 5 日～10 月 10 日および 2014 年 6 月 20 日～10 月 30 日であった。2015 年 11 月 30 日にこれらの樹をハウス外の露地へ移植した。2018 および 2019 年に再びこれらの樹を供試した。

2) ‘Snowdrift’における新梢の強剪定

2013 年には 6 月 5 日から 8 月 15 日まで、2014 年には 6 月 5 日から 8 月 14 日まで、2018 年には 6 月 25 日から 8 月 25 日まで、2019 年には 6 月 14 日から 8 月 3 日まで約 10 日間隔で 1 樹ごと全新梢の基部 0.5～1cm を残して切除した。同時に葉および果実も切除した。

3) ‘Snowdrift’における新梢の伸長および開花

新梢を切除した樹は新たに萌芽し、新梢伸長が再開された。新たに伸長した芽のうちで生育が比較的良好な新梢を 1 樹あたり 5 本 (2013 および 2014 年)、または 10 本 (2018 および 2019 年) 選び、印を付けた。これらの新梢の長さおよび葉数を 10 日おきに、伸長が停止するまで調査した。翌春にこれらの新梢の開花数を調査した。

結果

1) 強剪定が新梢伸長に及ぼす影響

2013年6月5日、6月15日、6月25日、7月5日、7月15日、7月27日、8月5日および8月15日に剪定した樹の補光区における新梢伸長停止期は、それぞれ9月14日、8月5日、9月14日、9月6日、9月27日、9月14日、9月27日および10月4日で、伸長停止期の平均新梢長は、それぞれ134.6cm、31.1cm、71.0cm、41.8cm、78.5cm、39.0cm、30.0cm および24.7cm であった。葉齢の増加停止期も新梢伸長停止期とほぼ同じであった。2013年6月5日、6月15日、6月25日、7月5日、7月15日、7月27日、8月5日および8月15日に剪定した樹の補光区における伸長停止期の平均葉齢は、それぞれ44.8、14.4、27.0、18.6、28.0、18.2、15.6 および14.4 であった（第3.2.1図）。

2013年6月5日、6月15日、6月25日、7月5日、7月15日、7月27日、8月5日および8月15日に剪定した樹の無補光区における新梢伸長停止期は、それぞれ7月15日、7月27日、8月15日、9月6日、9月27日、9月27日、9月6日および9月27日で、伸長停止期の平均新梢長は、それぞれ22.1cm、16.5cm、12.4cm、15.7cm、45.3cm、31.2cm、12.0cm および4.1cm であった。葉齢の増加停止期も新梢伸長停止期とほぼ同じであった。2013年6月5日、6月15日、6月25日、7月5日、7月15日、7月27日、8月5日および8月15日に剪定した樹の無補光区における伸長停止期の平均葉齢は、それぞれ15.0、10.0、10.4、11.2、19.6、16.4、9.2 および6.6 であった（第3.2.2図）。

2014年6月5日、6月14日、6月25日、7月5日、7月16日、7月25日、8月6日および8月14日に剪定した樹の補光区における新梢伸長停止期は、それぞれ8月6日、9月15日、8月6日、8月23日、8月23日、9月15日、9月24日および9月24日であり、伸長停止期の平均新梢長は、それぞれ45.2cm、82.8cm、24.7cm、29.1cm、

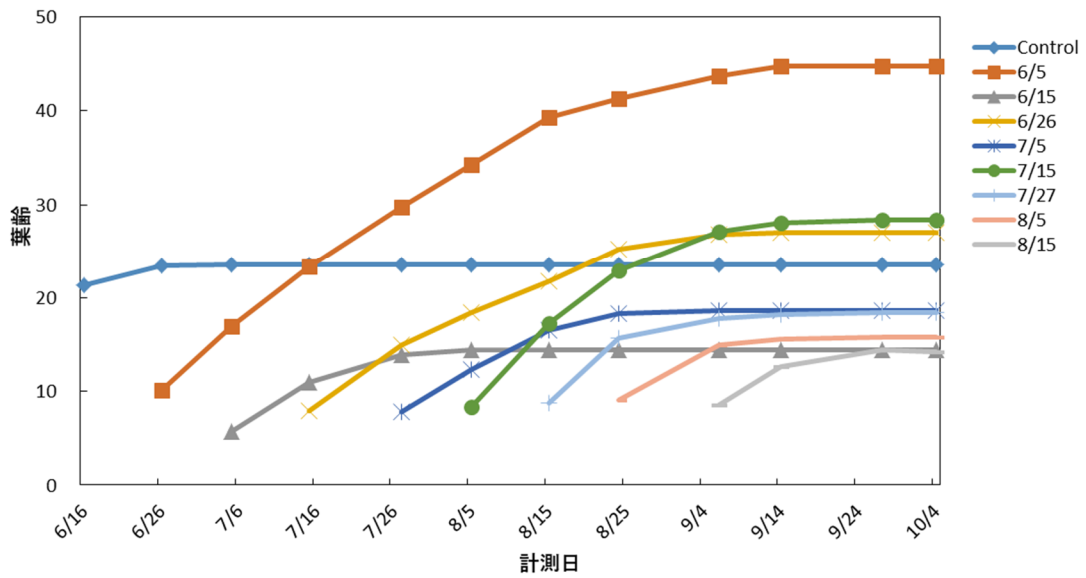
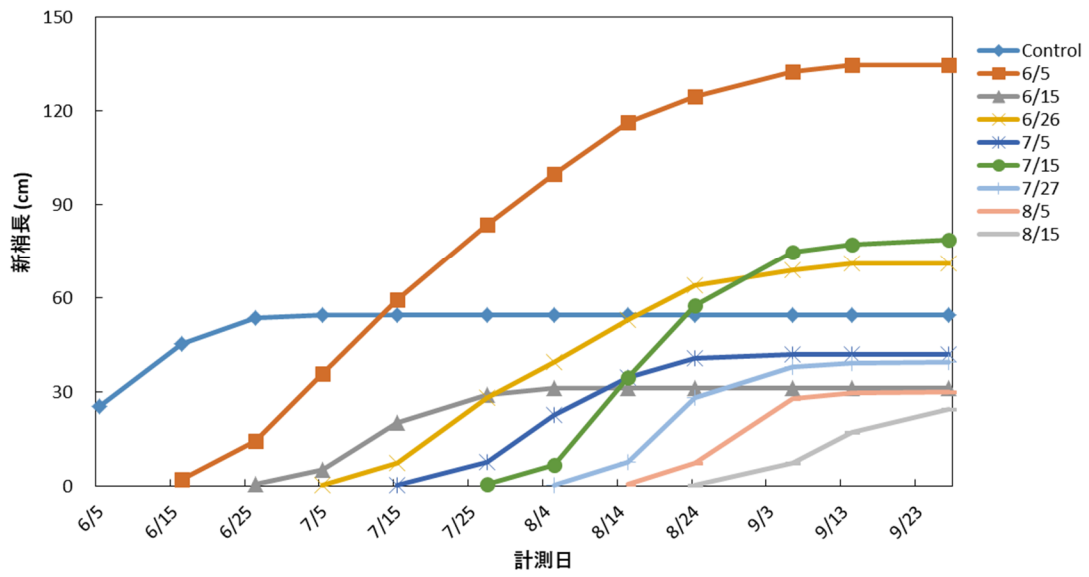
25.8cm、18.8cm、22.0cm および 12.1cm であった。葉齢の増加停止期も新梢伸長停止期とほぼ同じであった。2014年6月5日、6月14日、6月25日、7月5日、7月16日、7月25日、8月6日および8月14日に剪定した樹の補光区における伸長停止期の平均葉齢は、それぞれ18.6、38.3、17.6、19.4、16.6、14.0、19.0 および 15.5 であった（第3.2.3図）。

2014年6月5日、6月14日、6月25日、7月5日、7月16日、7月25日、8月6日および8月14日に剪定した樹の無補光区における新梢伸長停止期は、それぞれ7月25日、7月25日、8月6日、8月14日、8月23日、9月4日、9月15日および9月4日であり、伸長停止期の平均新梢長は、それぞれ19.0cm、38.6cm、25.9cm、25.8cm、25.3cm、15.4cm、12.0cm および 0.9cm であった。葉齢の増加停止期も新梢伸長停止期とほぼ同じであった。2014年6月5日、6月14日、6月25日、7月5日、7月16日、7月25日、8月6日および8月14日に剪定した樹の無補光区における伸長停止期の平均葉齢は11.4、18.8、16.6、16.0、15.4、12.2、12.0 および 7.4 であった（第3.2.4図）。

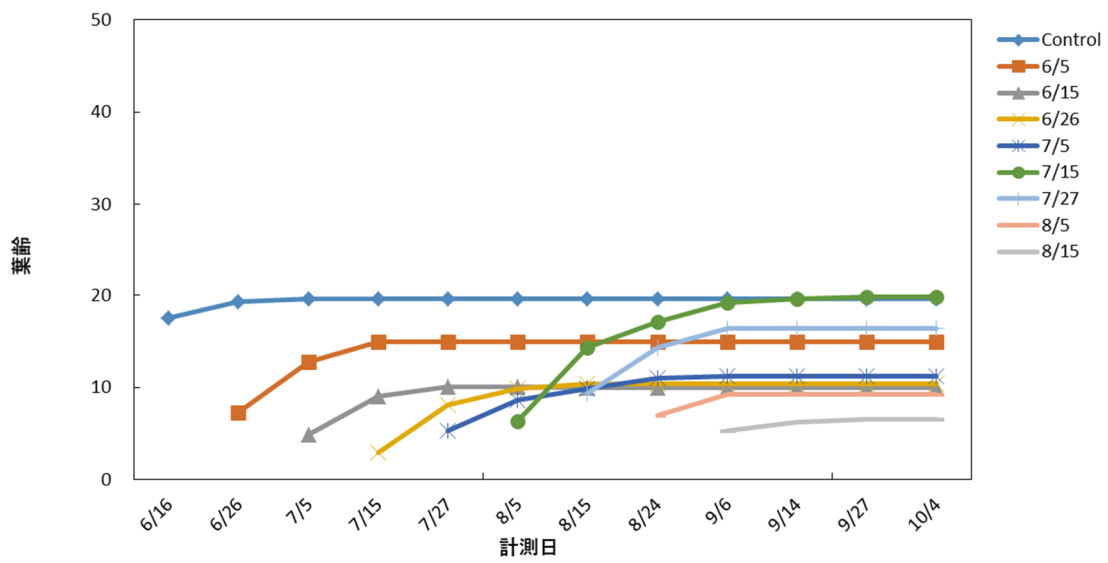
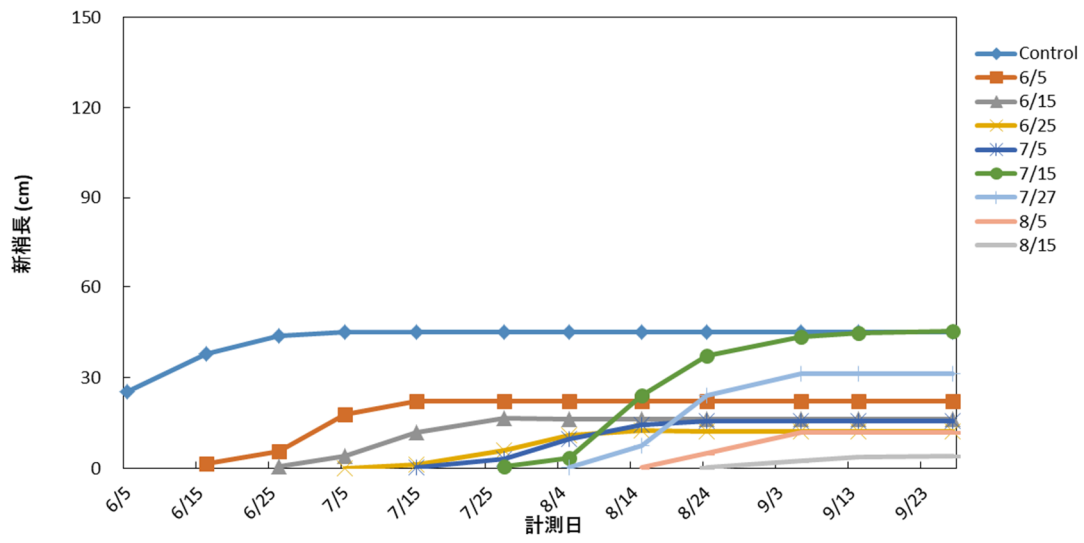
2018年6月25日、7月5日、7月15日、7月25日、8月5日、8月15日および8月25日に剪定した樹の新梢伸長停止期は、それぞれ8月15日、8月15日、8月25日、8月25日、9月5日、9月5日および10月5日であり、伸長停止期の平均新梢長は、それぞれ30.0cm、15.1cm、7.8cm、0.2cm、10.6cm、0.4cm および 0.5cm であった。葉齢の増加停止期も新梢伸長停止期とほぼ同じであった。2018年6月25日、7月5日、7月15日、7月25日、8月5日、8月15日および8月25日に剪定した樹の伸長停止期の平均葉齢は、それぞれ15.5、11.2、7.5、3.1、10.0、3.5 および 4.0 であった（第3.2.5図）。

2019年6月14日、6月24日、7月4日、7月14日、7月24日および8月3日に剪定した樹の新梢伸長停止期は、それぞれ8月23日、8月13日、9月2日、9月12

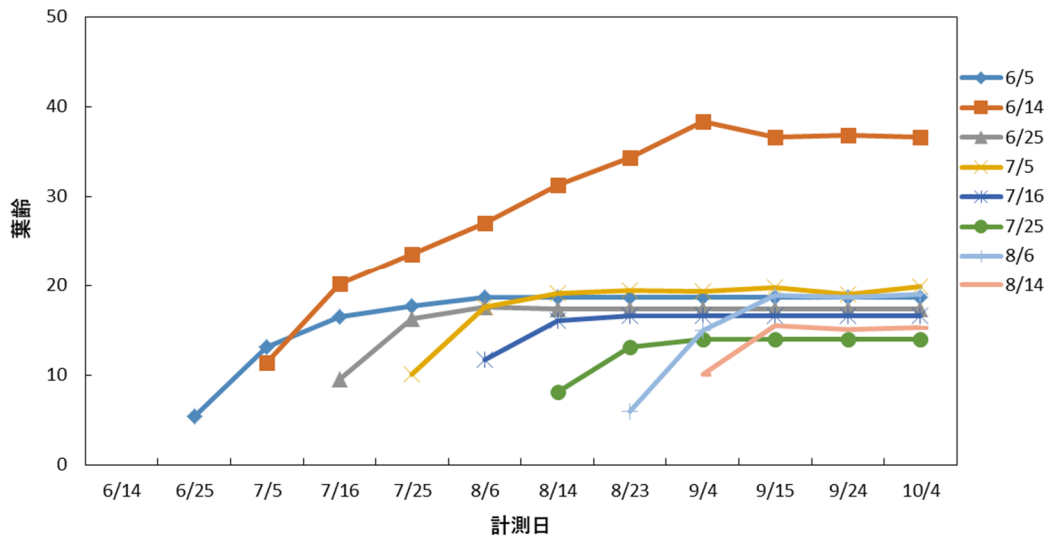
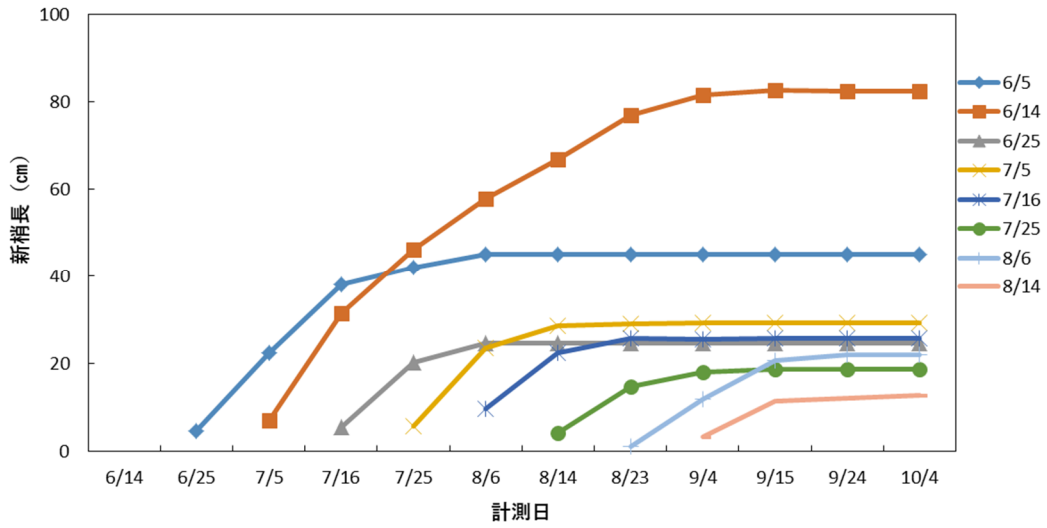
日、9月12日および9月2日であり、伸長停止期の平均新梢長は、それぞれ36.3cm、31.9cm、32.3cm、16.8cm、18.5cm および7.5cm であった。葉齢の増加停止期も新梢伸長停止期とほぼ同じであった。2019年6月14日、6月24日、7月4日、7月14日、7月24日および8月3日に剪定した樹の伸長停止期の平均葉齢は、それぞれ17.5、15.2、16.6、10.8、11.8 および4.9 であった（第3.2.6図）。



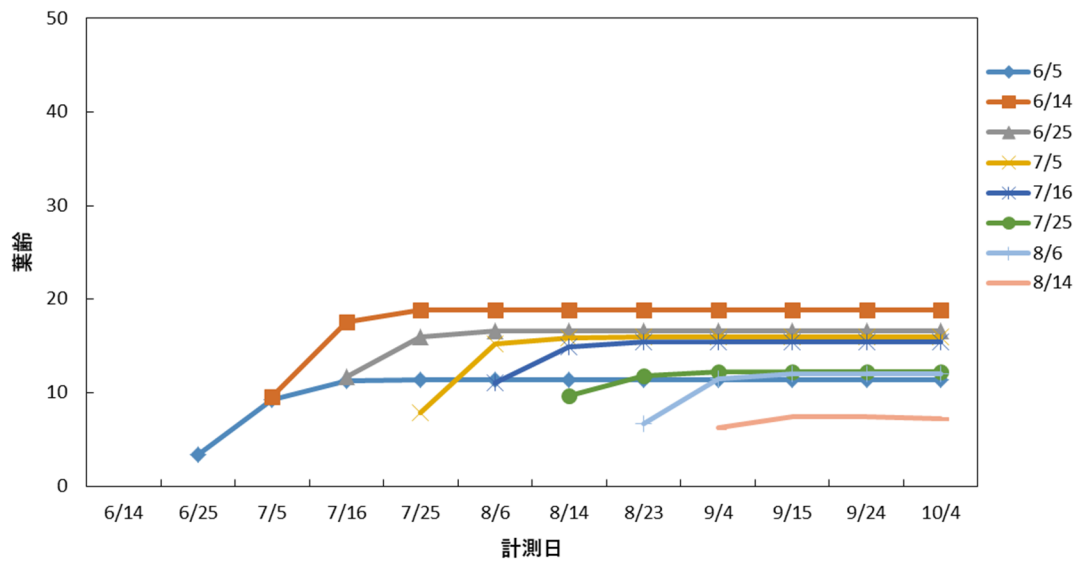
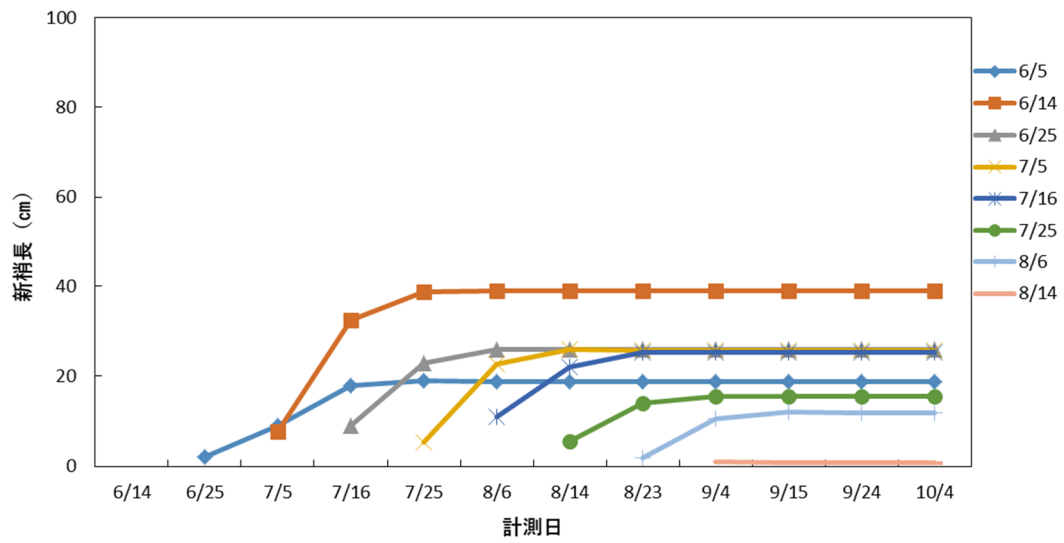
第 3.2.1 図 2013 年の補光区における強剪定が ‘Snowdrift’ の新梢長と葉齢に及ぼす影響



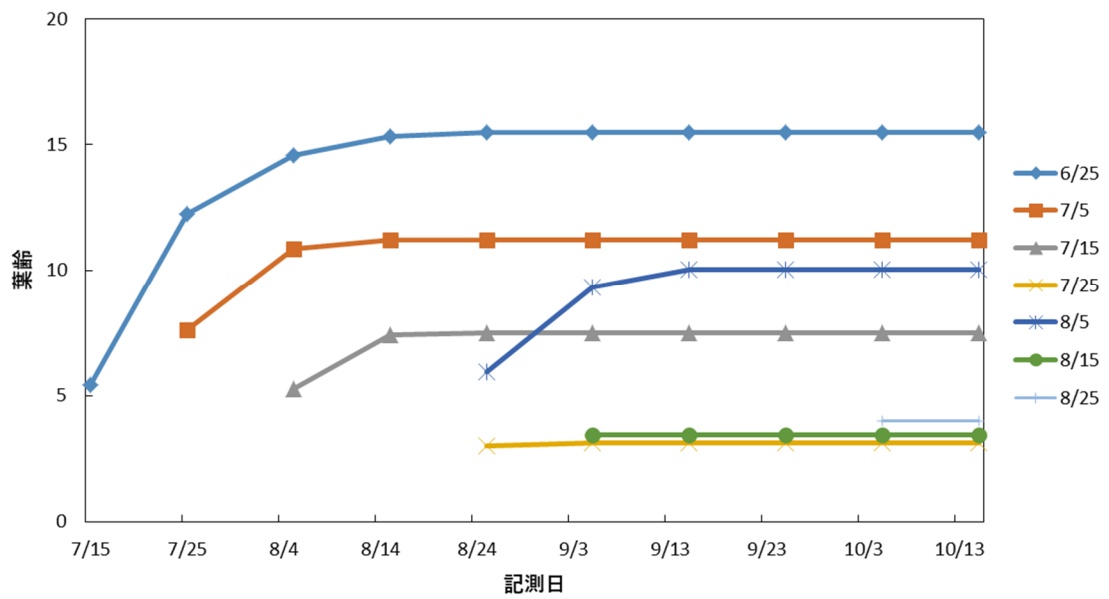
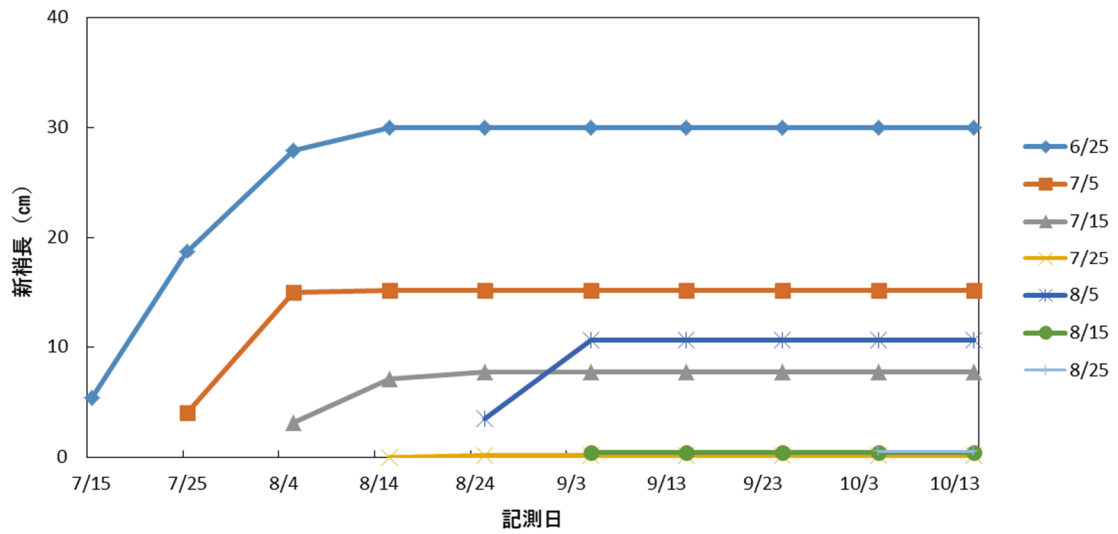
第 3.2.2 図 2013 年の無補光区における強剪定が ‘Snowdrift’ の新梢長と葉齢に及ぼす影響



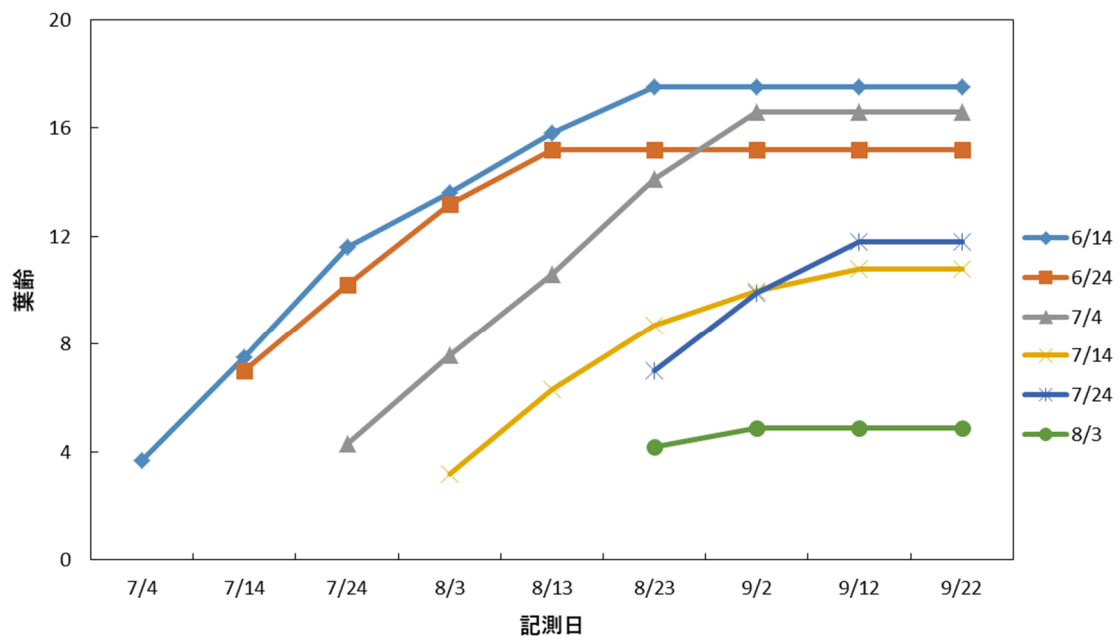
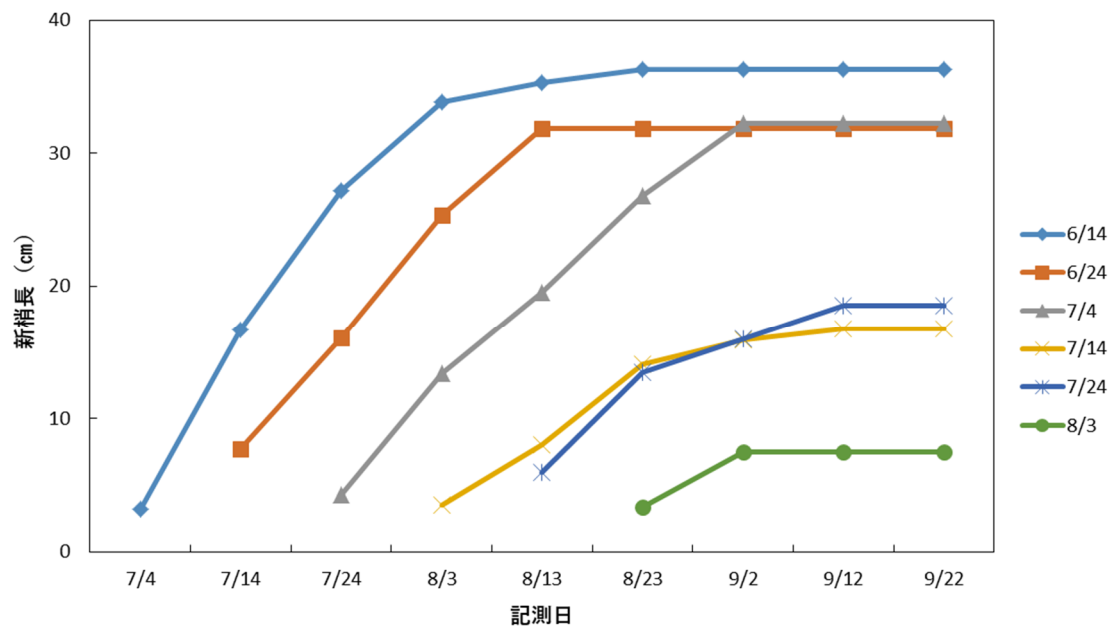
第 3.2.3 図 2014 年の補光区における強剪定が 'Snowdrift' の新梢長と葉齢に及ぼす影響



第 3.2.4 図 2014 年の無補光区における強剪定が ‘Snowdrift’ の新梢長と葉齢に及ぼす影響



第 3.2.5 図 2018 年における強剪定が ‘Snowdrift’ の新梢長と葉齢に及ぼす影響



第 3.2.6 図 2019 年における強剪定が 'Snowdrift' の新梢長と葉齢に及ぼす影響

2) 強剪定が翌年の開花に及ぼす影響

2013年の無補光区では、6月5日～7月5日に剪定した場合、翌年に開花した。開花した新梢の長さは0.5～38cm、葉齢は5～19、新梢あたりの花そう数は1～11個、新梢内で開花した芽の割合は7.1～68.8%であった。2013年の補光区でも、6月5日～7月5日に剪定した場合、翌年に開花した。開花した新梢の長さは10.1～56cm、葉齢は8～26、新梢あたりの花そう数は1～9個、新梢内で開花した芽の割合は4.2～50%であった(第3.2.1表)。

2014年の無補光区では、6月5日に剪定した場合のみ、翌年に開花した。開花した新梢の長さは8.5～28cm、葉齢は7～15、新梢あたりの花そう数は1～6個、新梢内で開花した芽の割合は12.5～40%であった。2014年の補光区でも、6月5日に剪定した場合のみ、翌年に開花した。開花した新梢の長さは26～38cm、葉齢は13～27、新梢あたりの花そう数は1～3個、新梢内の開花した芽の割合は3.7～20%であった(第3.2.1表)。

2018年では、6月25日～8月5日に剪定した場合、翌年に開花した。開花した新梢の長さは8.5～65.2cm、葉齢は8～29、新梢あたりの花そう数は1～5個、新梢内の開花した芽の割合は9.1～21.4%であった(第3.2.2表)。

2019年では、6月14日に剪定した場合のみ、翌年に1本の新梢上で開花した。開花した新梢の長さは70.5cm、葉齢は27、新梢あたりの花そう数は7個、新梢内の開花した芽の割合は25.9%であった(第3.2.2表)。

2013年における補光区では、伸長停止した新梢数が最も多い時期は9月6日であった。6月26日～9月6日までに伸長停止した新梢で開花した。開花した新梢の割合は7月27日～8月15日に伸長停止した新梢では100%であったが、新梢内で開花した芽の割合が多いのは、7月27日および9月6日に伸長停止した新梢であった。開花した新梢で最も遅い伸長停止期は9月6日であった。2013年における無補光区では、伸長停

止した新梢数が最も多い時期は9月6日および9月14日であった。7月5日～9月6日までに伸長停止した新梢で開花した。開花した新梢の割合は8月24日に伸長停止した新梢では100%であったが、新梢内で開花した芽の割合が多いのは、8月5日に伸長停止した新梢であった。開花した新梢で最も遅い伸長停止期は9月6日であった。

2014年における補光区では、伸長停止した新梢数が最も多い時期は8月23日であった。7月16日および7月25日に伸長停止した新梢で開花した。開花した新梢の割合および新梢内で開花した芽の割合が最も多いのは、ともに7月25日に伸長停止した新梢であった。開花した新梢で最も遅い伸長停止期は7月25日であった。2014年における無補光区では、伸長停止した新梢数が最も多い時期は8月6日および9月6日であった。7月16日および8月6日に伸長停止した新梢で開花した。開花した新梢の割合および新梢内で開花した芽の割合が最も多いのは、7月16日に伸長停止した新梢であった。開花した新梢で最も遅い伸長停止期は8月6日であった。

2018年において、伸長停止した新梢数が最も多い時期は9月5日であった。8月5日～9月5日に伸長停止した新梢で開花した。開花した新梢の割合は8月15日に伸長停止した新梢で最も多く36.4%であった。新梢内で開花した芽の割合が最も多いのは、9月5日に伸長停止した新梢であった。開花した新梢で最も遅い伸長停止期は9月5日であった。

2019年において、伸長停止した新梢数が最も多い時期は9月2日であった。8月13日に伸長停止した新梢でのみ開花した。

第 3.2.1 表 2013 および 2014 年に強剪定を施した樹体の翌年の開花状況

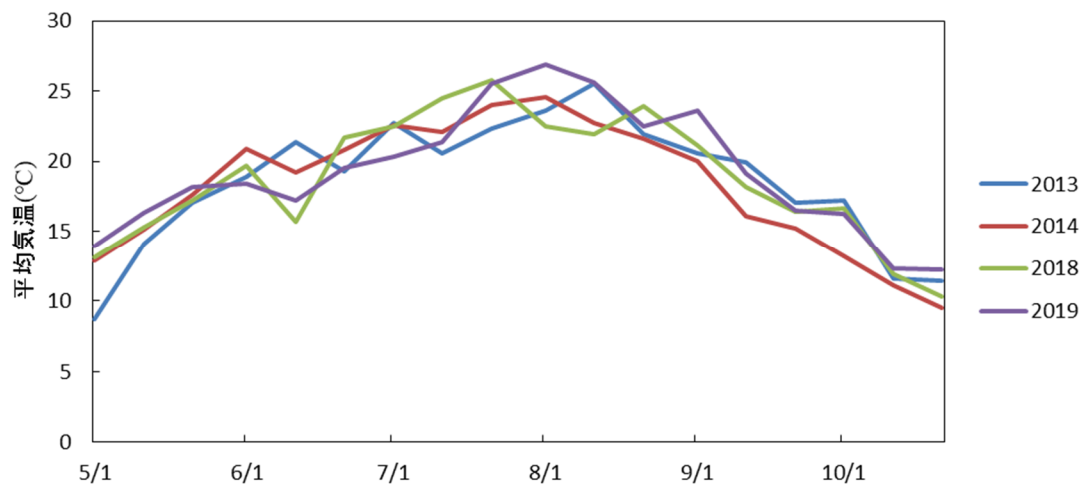
年次	補光	剪定時期 (M/D)	新梢伸長停止時期 (M/D)	新梢長 (cm)	葉齢	花そう数	新梢内の開花した 芽の割合(%)	
2013	無	6/5	7/15	33	18	5	27.8	
		6/15	6/26	0.5	5	1	20.0	
		6/15	7/27	38	16	11	68.8	
		6/15	7/27	17.5	10	3	30.0	
		6/15	7/27	14	10	6	60.0	
		6/15	7/27	12.5	9	3	33.3	
		6/26	7/15	0.8	6	1	16.7	
		6/26	7/27	3.2	6	1	16.7	
		6/26	8/15	18.3	14	1	7.1	
		6/26	8/5	13.3	11	1	9.1	
		6/26	8/15	25.7	15	5	33.3	
		7/5	9/6	17.6	13	8	61.5	
		7/5	8/24	9.2	8	1	12.5	
		7/5	8/15	4.3	6	1	16.7	
	7/5	8/24	11.9	10	5	50.0		
	7/5	9/6	35.3	19	10	52.6		
		Control		7/5	45	19.6	12.8	63.6
		有	6/5	7/5	10.1	26	2	7.7
	6/15		8/15	46.5	18	1	12.5	
	6/15		8/5	11.5	8	1	50.0	
	6/15		8/5	38	18	9	50.0	
6/15	8/5		34.5	16	8	41.7		
6/15	8/5		25	12	5	31.9		
7/5	8/24		48	21	1	4.8		
7/5	8/15		16.7	11	1	9.1		
		7/5	8/24	55.5	22	1	4.5	
		7/5	9/6	56	15	1	4.2	
		Control	7/5	54.5	23.6	12.6	52.6	
2014	無	6/5	7/25	27	15	6	40.0	
		6/5	7/25	28	14	4	28.6	
		6/5	7/25	10	7	2	28.6	
		6/5	7/16	8.5	8	1	12.5	
		6/5	7/25	20	13	2	15.4	
		Control	7/16	74.3	27.4	10.2	37.2	
		有	6/5	7/16	38	15	3	20.0
	6/5		8/6	72	27	1	3.7	
	6/5		7/16	35	16	2	12.5	
	6/5		7/16	26	13	1	7.7	
	Control		8/6	131.2	42.6	23.8	55.9	

第 3.2.2 表 2018 および 2019 年における強剪定による翌年の開花

年次	剪定時期(M/D)	新梢伸長停止時期(M/D)	新梢長(cm)	葉齡	花そう数	開花節	新梢内の開花した 芽の割合(%)
2018	6/25	8/5	11.2	11	1	1	9.1
	6/25	8/15	59.3	21	1	1	4.8
	6/25	8/15	65.2	29	5	1~5	17.2
	7/5	8/15	22.8	14	3	1~3	21.4
	7/5	8/5	13.3	12	1	1	8.3
	7/5	8/5	17.1	11	1	1	9.1
	7/15	8/15	17.0	9	1	1	11.1
	8/5	9/5	15.8	11	2	1~2	18.2
	8/5	9/5	8.5	8	1	1	12.5
	8/5	9/5	17.8	13	2	1~2	15.4
2019	6/14	8/13	70.5	27	7	1~7	25.9
	Control	-	59.46	21.4	14.6	-	68.2

第 3.2.3 表 4 年間における新梢伸長停止期ごとの翌年の開花

年次	補光	新梢伸長停止時期 (M/D)	新梢数	新梢長 (cm)	開花した新梢数	開花した新梢長 (cm)	開花した新梢の割合 (%)	新梢内で開花した芽の割合 (%)
2013	無	6/16	2	35.3	0	-	0	0
		6/26	2	28.5	1	0.5	50.0	20.0
		7/5	3	32.2	0	-	0	0
		7/15	5	18.9	2	16.9	40.0	25.0
		7/27	5	14.2	5	17.0	100.0	47.1
		8/5	1	13.3	1	13.3	100.0	9.1
		8/15	3	16.1	3	16.1	100.0	20.0
		8/24	4	16	2	10.6	50.0	33.3
		9/6	14	19.1	2	26.5	14.3	56.3
		9/14	3	29.2	0	-	0	0
	9/27	3	39.8	0	-	0	0	
	有	6/26	1	48.0	0	-	0	0
		7/5	4	56.1	1	10.1	25.0	7.7
		7/15	0	-	0	-	-	-
		7/27	0	-	0	-	-	-
		8/5	6	31.3	4	27.3	66.7	42.6
		8/15	5	55.7	2	31.6	40.0	6.9
		8/24	2	51.8	2	51.8	100.0	4.7
		9/6	10	49.7	1	56.0	10.0	6.7
		9/14	10	82.8	0	-	0	0
9/27		6	47.4	0	-	0	0	
10/4	1	24.5	0	-	0	0		
2014	無	7/5	4	71.1	0	-	0	0
		7/16	4	30	1	8.5	25.0	12.5
		7/25	7	35.6	4	21.3	57.1	28.6
		8/6	7	23.3	0	-	0	0
		8/14	2	29.0	0	-	0	0
		8/23	9	22.8	0	-	0	0
		9/4	6	11.3	0	-	0	0
		9/15	6	4.3	0	-	0	0
	有	7/5	1	109.0	0	-	0	0
		7/16	5	68.1	3	33.0	60.0	13.6
		7/25	1	144	0	-	0	0
		8/6	10	50.1	1	72.0	10.0	3.7
		8/14	0	-	0	-	-	-
		8/23	9	27.2	0	-	0	0
2018	無	7/25	2	10.5	0	-	0	0
		8/5	15	15.9	3	13.9	20.0	8.8
		8/15	11	20.9	4	41.1	36.4	13.7
		8/25	12	3.5	0	-	0	0
		9/5	20	5.6	3	14.0	15.0	15.6
		9/15	0	-	0	-	-	-
		9/25	0	-	0	-	-	-
		10/5	10	0.5	0	-	0	0
2019	無	8/3	4	21.3	0	-	0	0
		8/13	10	34.7	1	70.5	10.0	25.9
		8/23	19	27.3	0	-	0	0
		9/2	21	16.1	0	-	0	0
		9/12	6	24.2	0	-	0	0



第 4.2.7 図 2013～2019 年の 5～10 月の平均気温（10 日ごと）の推移

考察

Piringer and Downs (1958) はリンゴを 8 時間の自然日長に加え、白熱灯で 4 時間 (12 時間日長)、6 時間 (14 時間日長) および 8 時間の補光 (16 時間日長) で栽培したとき、16 時間日長で主幹の生長量が最も多くなり、花芽数も増加することを報告した。ただし、16 時間日長でも光源に蛍光灯を用いた場合、花芽分化しないことも示した。また、Stahly and Piringer (1962) は、リンゴ栽培において自然光 8 時間に加え、白熱灯で 4 時間補光した場合、花芽数が多くなること、また、総生長量は白熱灯による補光で多くなり、補光の光源は白熱灯よりも蛍光灯で全生長量が多くなることを報告した。さらに、Tromp (1984) は、リンゴの栄養生長と花芽の形成は、短日条件 (8 時間) よりも長日条件 (14 時間) でかなり促進されることを報告したが、日長の影響というよりは、光量の違いがリンゴ樹の生長に影響したと考察している。このように、リンゴの新梢生長と花芽形成は短日よりも長日条件で促進されるが、その効果は光源の種類により異なり、補光の光源が白熱灯の場合、花芽分化を促進し、補光の光源が蛍光灯の場合、新梢生長を促進すると考えられた。本実験では、高圧ナトリウムランプによる補光区における新梢伸長が無補光区よりも 1.5~2.5 倍に促進された。また、開花した新梢数は、補光区では無補光区よりも約 10~30% 少なかった。一般的な白熱灯、蛍光灯および高圧ナトリウムランプでは、高圧ナトリウムランプの波長は白熱灯に似ている (浜本・山崎、2013)。しかし、本実験において、高圧ナトリウムランプの影響は白熱灯とは異なった。これは単に波長の影響だけでなく、光量の違いも影響していると考えられるため、今後、この点について確認が必要である。

補光区の新梢伸長停止時期は無補光区より遅い傾向がみられた (第 3.2.3 表)。4 年間とも、7 月下旬~8 月上旬に伸長停止した新梢が開花しやすかった。また、9 月 14 日以後に伸長停止した新梢は、どの年にも開花しなかった。これは、9 月 14 日に伸長停止後、新梢はすぐに自発休眠に入り、花芽分化できない状態にあったものと推察された。

このように、補光は新梢の栄養生長を促進し伸長停止時期を遅らせたことにより、間接的に花芽分化を抑制したと考えられた。各新梢伸長停止時期における開花した新梢の割合は年次により異なり、2019年の試験で開花数が最も少なかった。‘ふじ’は7月の平均気温が低い場合、花芽分化が促進され（長内ら、1990）、‘スパータン’および‘旭’の花芽分化は加温処理により抑制される（福井ら、1984）。したがって、本実験において2019年の7月下旬～8月の平均気温が他の調査年より高かったため（第4.2.7図）、花芽分化が抑制されたのかもしれない。一方、年次および補光の有無に関わらず、伸長停止時期が早いほど開花した新梢の割合が多いのではなく、開花した新梢の割合は二番目に早い伸長停止時期以降に最大値を示した。花芽分化には樹体中の炭水化物と窒素化合物の割合が関係していると考えられている（福井ら、1984）ことから、強剪定が樹体を一時的に衰弱させ、早期に伸長停止した新梢は花芽分化に必要な養分が不足したために花芽分化に至らなかったことが推察された。したがって、伸長停止時期が早い新梢でも栄養状態を早期に回復させることができれば、花芽分化した可能性がある。

4年間の調査において、補光区を除き開花した新梢の割合が最も高かった新梢伸長停止時期は、年次変動があったもののおおよそ7月25日～8月15日であった。7月25日以前および8月24日以降に伸長停止した新梢でも翌年の開花がみられたが、新梢内での開花した芽の割合は低かった。これらのことから、リンゴの花芽分化の限界時期は8月中旬であると推定した。本試験では、新梢の伸長停止期を通常よりも遅らせる目的で、発育期間中定期的に強剪定した。その結果、伸長停止期の早い新梢と遅い新梢では翌年の開花が少ないか、または皆無であったが、その原因は、新梢の伸長停止時期により異なることが示唆された。新梢の伸長停止時期は花成に大きな影響を与えるため、今後花芽分化の限界時期における芽中の栄養成分や植物ホルモン量、休眠状態などの解明により花芽分化限界時期を延長することができるようになるかもしれない。

IV. リンゴ 5 品種の休眠特性と低温要求の評価

緒言

温帯気候では、果樹は冬になると落葉と生長停止を伴う休眠と呼ばれる一種の自己防衛の状態に入る。Lang et al. (1987) によって定義された休眠の 3 つの段階、すなわち条件的休眠、自発休眠および他発休眠は、温帯果樹において最も一般的な区分である。条件的休眠は、頂芽優勢現象や葉の植物ホルモンバランス (Crabbé and Barnola, 1996; Watanabe et al., 2018) など植物の内的な要因によって調節されている。自発休眠は、植物が適切な生育環境下であっても発芽することができない状態である (Lang ら, 1987)。亜寒帯および温帯の木本植物は、自発休眠から覚醒するためには一定の低温に遭遇する必要がある (Hänninen, 2016)。自発休眠後、芽は正常に発育する能力を持っているが、低温や水分不足などの不適な環境条件のため、芽は休眠状態のままである (Montazeran et al., 2018)。樹体は強制的な休眠状態にあるため、この状態は他発休眠と呼ばれている。

インドネシア西部ジャワの高地では、リンゴ‘Rome Beauty’が年 2 回収穫されている (Janick, 1974; 湯田ら, 1981)。熱帯の高地で栽培されるリンゴ樹は果実を収穫しても落葉しない。そのため、3 月に 1 回目の果実を収穫し、その後にリンゴ樹のすべての葉を摘み取り、強制的に萌芽を誘導する。その結果、リンゴ樹は 4 月に開花し、10 月に 2 回目の果実を収穫できる。再び、収穫の 1 か月後にすべての葉を摘み取り、強制的に萌芽させる。その結果、リンゴ樹は 12 月に開花し、翌年 4 月に果実を収穫できる。摘葉の適期は、花芽付近に着生した葉の葉柄が結果枝に対して直角に傾いたときである (Janick, 1974)。もし、摘葉の適期が早過ぎた場合、頂芽は萌芽しても栄養生長のみを示す。このことから、花芽を強制的に萌芽させるための摘葉の適期は、結果枝に花芽が分化し、かつ花芽が条件的休眠期の状態のときであると推察される。従って、我が国においてもリンゴの休眠特性を把握することによって、収穫時期を調節した作型の開発が

可能になると考えられる。例えば、リンゴ樹を自発休眠開始前の条件的休眠期に開花誘導できれば (Watanabe et al., 2018)、加温や補光可能なハウス内で従来とは異なる時期に果実を収穫することができるだろう。また、これらの栽培技術は育種年限を短縮させることにも応用できると考えられる。

リンゴも含めた落葉果樹の休眠特性に関しては、いくつかの報告がある。リンゴにおいて葉芽の休眠状態の変化は気温の変化と関連するため (Malagi et al., 2015)、リンゴの休眠状態は積算気温に大きく影響される。また、モモの開花日は低温要求と高温要求により決定されるため、開花日はモモ栽培地の気候に影響される (Fan et al., 2010)。さらに、中国南京においてウメ 69 品種の休眠打破に必要な低温要求および高温要求が評価され、高温要求はそれらの品種の原生地と関係がなかったが、栽培地域との関係がみられた (Zhuang ら、2016)。このように、休眠と気温の関係は栽培地域によって変化すると考えられる。加えて、これまでに多くのリンゴ品種の休眠特性が報告されているが、報告ごとに調査地が異なるだけでなくチルユニットモデルも異なるため、各品種の休眠特性の比較と利用は難しい (Campoy et al., 2012; Funes et al., 2016; Ghariani and Stebbins, 1994; Hauagge and Cummins, 1991)。従って、品種ごとの休眠特性とそれらに及ぼす気温の影響を解明するためには、個別の地域ごとに対象とするリンゴ品種の休眠特性を同一圃場で数年間調査する必要がある。また、オウトウ‘佐藤錦’では、自発休眠打破に必要な低温は 1,650 時間であるが、シアナミド処理による休眠打破と生育促進の効果は低温積算が 1,650 時間時より 1,350 時間時の方が高い (渡辺ら、2006)。低温積算 1,350 時間時のシアナミド処理は、自発休眠覚醒期の休眠打破処理であったと推測される。従って、リンゴでも自発休眠の導入期、最深期および覚醒期を把握すれば、新しい作型の開発や育種年限の短縮に関する基礎的知見を得ることができると考えられる。

そこで本研究では、国内におけるリンゴの主要品種に加え、インドネシアでリンゴの二期作に使用されている‘Rome Beauty’ (Janick, 1974; 湯田ら、1981) を含む 5 品種の休

眠特性と低温要求を同一圃場において3または4年間調査した。

材料および方法

1) 供試材料および水挿し試験

岩手県滝沢市にある岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター滝沢農場（北緯 39 度 46 分、東経 141 度 7 分）において、2012-2013 年、2014-2015 年、2016-2017 年および 2018-2019 年の 4 年間、以下の調査を実施した。23 年生‘ふじ’（M.26 台木）、23 年生‘王林’（M.9 台木）、45 年生‘紅玉’（マルバカイドウ台木）、7 年生‘国光’（JM2 台木）および 7 年生‘Rome Beauty’（JM2 台木）を各 1 樹供試した（いずれも 2012 年 4 月の樹齢）。2012 年の‘ふじ’、‘王林’、‘紅玉’、‘国光’および‘Rome Beauty’の萌芽所要日数を 10 月 17 日から翌年 2 月 17 日まで調査した。2014 年の‘ふじ’、‘王林’、‘紅玉’および‘Rome Beauty’の萌芽所要日数を 9 月 1 日から翌年 2 月 27 日まで調査した。2016 年は、‘ふじ’、‘王林’、‘紅玉’、‘国光’および‘Rome Beauty’の萌芽所要日数については 10 月 3 日から翌年 2 月 22 日まで調査した。2018 年の‘ふじ’、‘王林’、‘紅玉’、‘国光’および‘Rome Beauty’の萌芽所要日数を 9 月 25 日から翌年 2 月 26 日まで調査した。

品種ごとに長さ 15~30cm の 1 年枝 7 本を各年の調査開始日から 2 週間ごとに採取した。試験地の近隣にあるアメダス好摩観測所（盛岡市玉山区好摩、北緯 39 度 52 分、東経 141 度 10 分）の 1981~2010 年における年平均気温は 9.4°C で、9 月から翌年 3 月までの平均気温は 4.3°C であった。

採取した枝は、品種ごとに区別し水挿し試験に供した。水と枝の腐敗を防ぐために、試験瓶内の水道水に 6% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液（キッチンハイター、花王（株））を 2,000 倍希釈になるように添加した。2012-2013 年、2014-2015 年および 2016-2017 年の試験では、水挿しした新梢は 25°C、蛍光灯 24 時間照射の条件下においた。2018-2019 年の試験のみ、水挿しした新梢は 25°C、高圧ナトリウムランプ（USHIO HILux Gro Super HPS600W）24 時間照射の条件下においた（第 4.1 図）。3 日おきに試験瓶内の水を交換

し、新梢基部を水切りした。新梢の採取日から 30 日間、毎日、頂芽から基部に向かって 7 番目までの芽の萌芽を調査し、萌芽日を記録した。芽の鱗片の割れ目から生長した葉の長さが、鱗片と同じ長さになったときを萌芽と定義した (Meier et al., 1994) (第 4.2 図)。



第 4.1 図 水挿し試験の様子 (2018 年)



第 4.2 図 萌芽と判定した状態

2) 休眠段階の推定

品種ごとに新梢の採取日と観察された萌芽日を用いて、新梢の採取日からの萌芽所要日数と萌芽率 (%) [(萌芽した新梢数/採取した新梢数) ×100] を算出した。萌芽率が減少し始め、萌芽所要日数が増加し始めたときを自発休眠導入期とみなした。ただし、新梢の採取開始日に萌芽率が既に減少し始め、萌芽所要日数が増加し始めていた場合、自発休眠導入期は新梢の採取開始日以前とみなした。また、萌芽率が 0%の期間を自発休眠最深期とした。ただし、新梢の採取開始日に萌芽率が既に 0%であった場合の自発休眠最深期は新梢の採取開始日以前とみなした。また、萌芽率 0%を示した時期が一採取日だけの場合、萌芽率 0%を示した採取日の直前の調査日を自発休眠最深期の開始日とみなした。その後、萌芽率が 50%以上になったとき、自発休眠覚醒期が完了されたとみなした

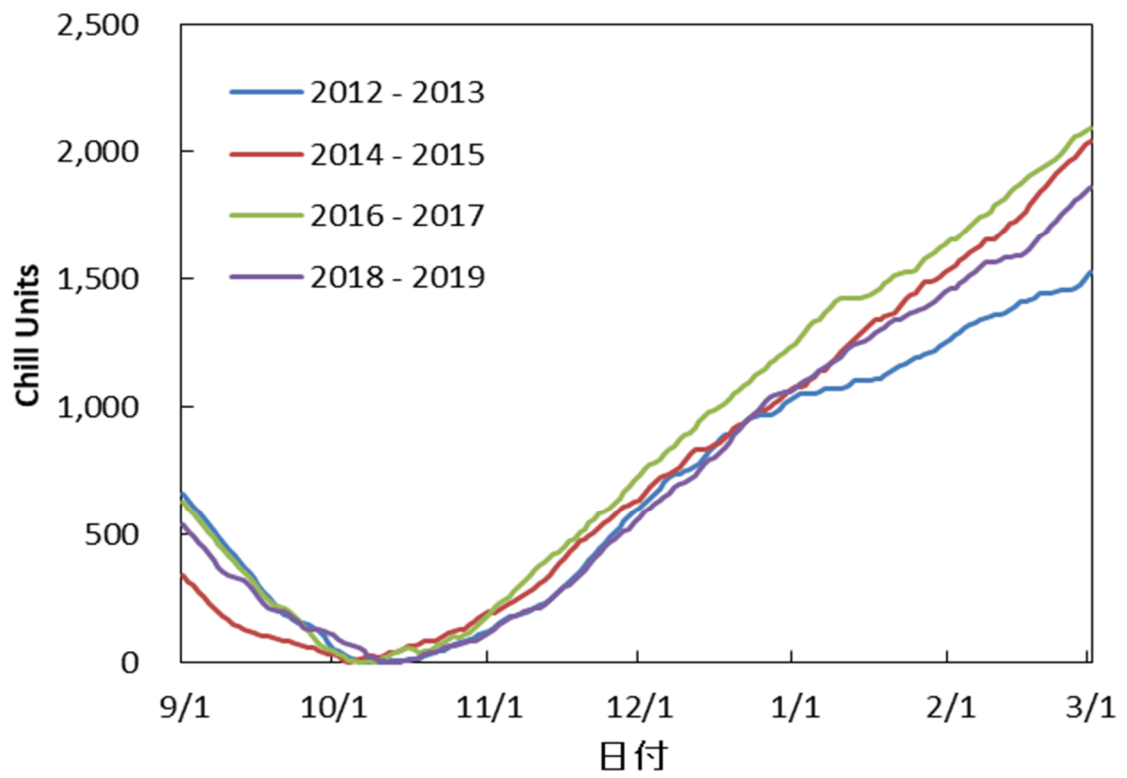
3) チルユニットの算出

Guak and Neilsen (2013) がリンゴ‘Gala’に適用した、温度によって低温積算に対する寄与が異なるとみなす方法に従って、4年間の9月から翌年3月までのチルユニット (CU) を算出した。すなわち、-2.1°C以下と 13.1~16.0°Cまでは 0 CU、-2.0~5.5°Cまでは 1 CU、5.6~7.0°Cは 0.75 CU、7.1~9.0°Cは 0.5 CU、9.1~13.0°Cは 0.25 CU、16.1~18.0°Cまでは -0.5 CU、18.1°C以上は -1 CU の係数を付与した。1日ごと、各温度帯の時間数にこれらの係数を乗じて、CU を算出した。CU を日ごとに積算し、CU 積算が減少から増加に変化した時点が低温感受開始期とした。この低温感受開始期の CU が 0 になるように再計算し、新たに CU 積算の推移図を作成した。また、低温感受開始期から自発休眠覚醒期の完了日までの CU 積算を自発休眠打破に必要な低温要求とみなした。

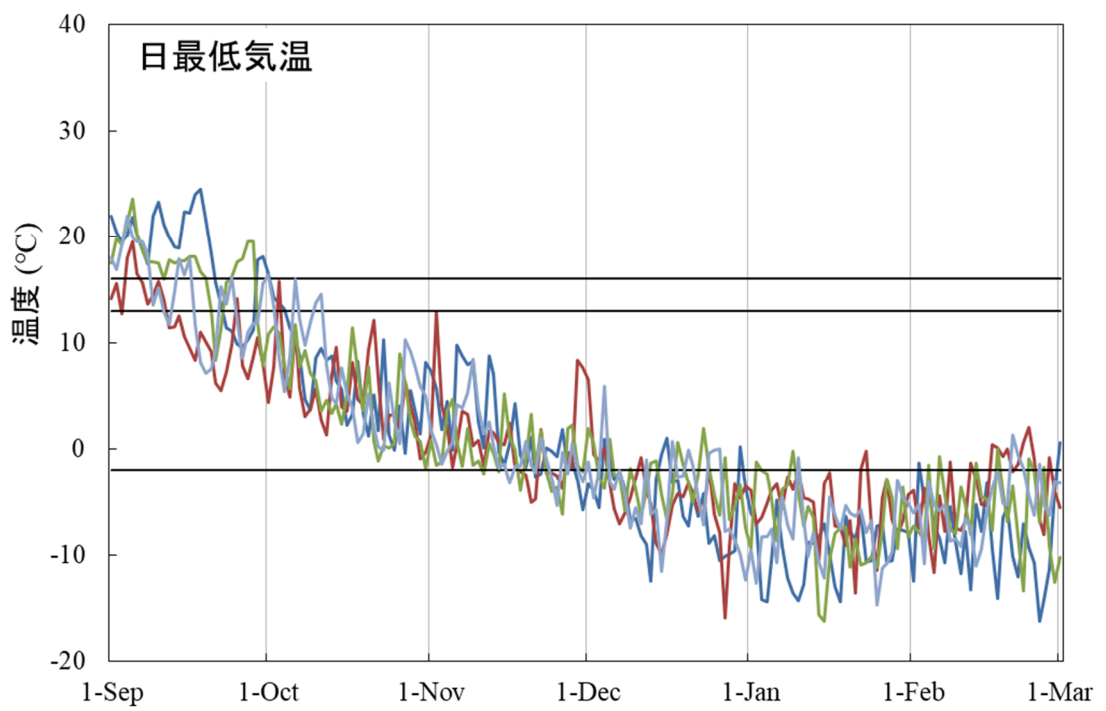
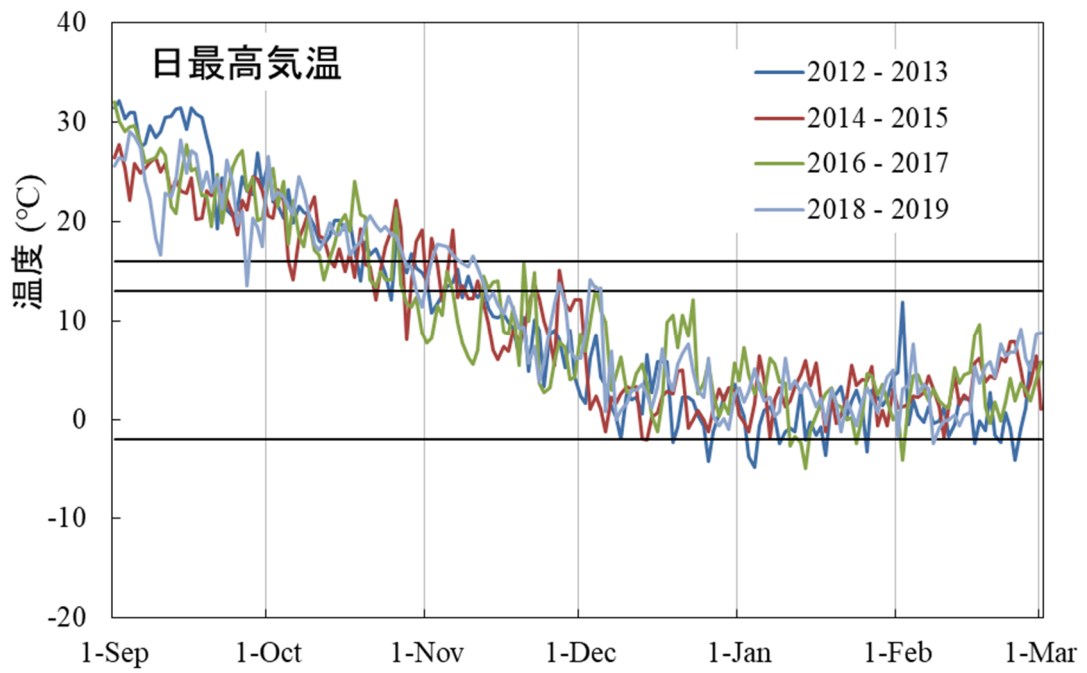
結果

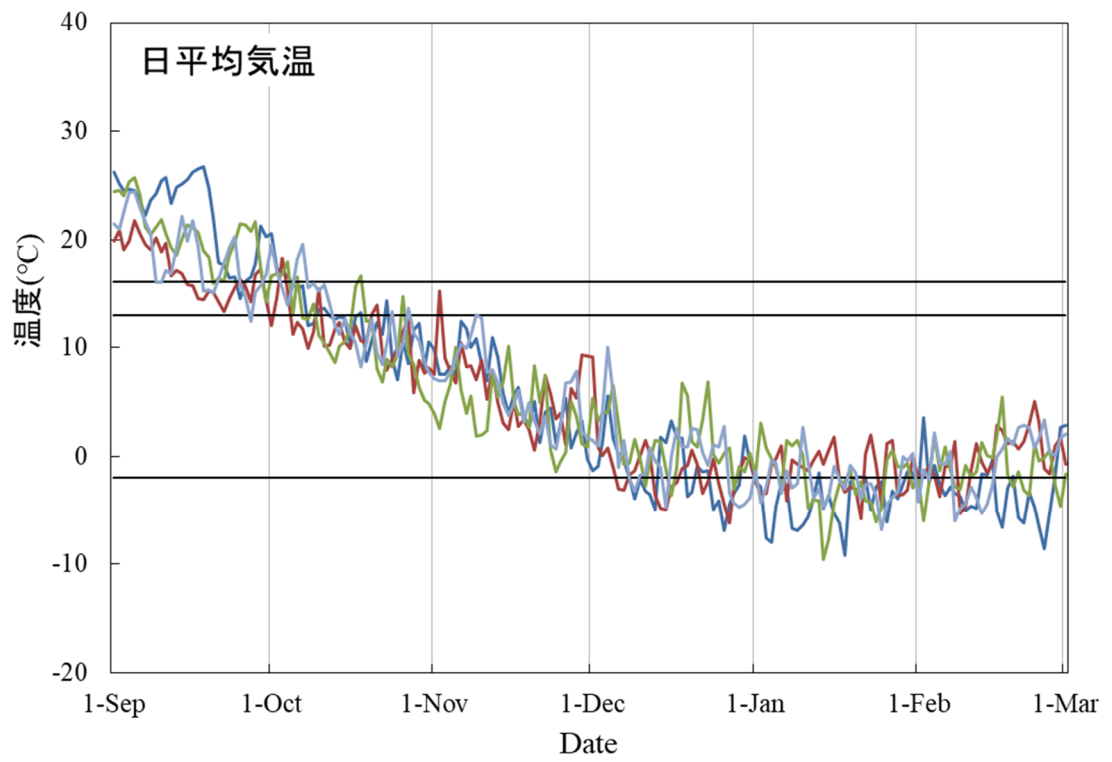
1) 各調査年次における CU 積算

試験地の近隣にあるアメダス好摩観測所における 2012 年、2014 年、2016 年および 2018 年の 9 月 1 日から翌年 3 月 1 日までの CU 積算の変化を第 4.3 図に示した。低温感受開始日は、2012 年では 10 月 7 日、2014 年では 10 月 4 日、2016 年では 10 月 6 日および 2018 年では 10 月 12 日であった。2012 年における低温感受開始日から 11 月 1 日、12 月 1 日、1 月 1 日、2 月 1 日および 3 月 1 日までの CU 積算は、それぞれ 124、604、1,039、1,263 および 1,525 であった。同様に、2014 年における CU 積算は、それぞれ 198、636、1,077、1,541 および 2,044 で、2016 年における CU 積算は、それぞれ 189、731、1,248、1,653 および 2,093 で、2018 年における CU 積算は、それぞれ 130、590、1,092、1,467 および 1,876 であった。2016 年の CU 積算は他の年よりも多く、2012 年の CU 積算は最も少なかった。試験地において、最も効果的な低温は 11 月および 12 月に多かった（第 4.4 図）。また、2013 年 1 月および 2 月において -2°C 以下の低温が多く、この 2 か月間の CU 積算は横ばいになった。



第 4.3 図 4 年間の 9 月 1 日から翌年 3 月 1 日までの CU 積算の変化





第 4.4 図 4 年間の 9 月 1 日から翌年 3 月 1 日までの日気温変化

2) 水挿し試験におけるリンゴ5品種の萌芽率および萌芽所要日数の変化

2012年の萌芽率が0%に達した時期は、‘紅玉’では調査を開始した10月17日またはそれ以前であった(第4.5図)。「ふじ」および「国光」では、11月1日に萌芽率が0%まで減少した。「王林」および「Rome Beauty」の萌芽率が0%まで減少した時期は、それぞれ11月14日および11月28日であった。「王林」の萌芽率は12月13日に増加し、100%に達した。「ふじ」の萌芽率は12月13日から増加し始め、2013年1月9日に萌芽率が100%に達した。「国光」の萌芽率は、12月26日に増加し、100%に達した。「紅玉」および「Rome Beauty」の萌芽率は12月26日から増加し始め、2013年1月9日に100%に達した。

2012年の‘紅玉’では調査を開始した10月17日またはそれ以前に萌芽所要日数が30日に達し、5品種の中で最も早かった(第4.5図)。「ふじ」と「国光」では11月1日、「王林」では11月14日に萌芽所要日数が30日に達した。「Rome Beauty」の萌芽所要日数が30日に達した時期は11月28日で、5品種の中で最も遅かった。「ふじ」と「王林」の萌芽所要日数は12月13日から、「紅玉」、「国光」および「Rome Beauty」の萌芽所要日数は12月26日から減少し始めた。12月26日以降、「王林」の萌芽所要日数は横ばいに推移し、1月24日以降、「ふじ」、「紅玉」、「国光」および「Rome Beauty」の萌芽所要日数も横ばいに推移した。

2014年の萌芽率が0%まで減少した時期は、「Rome Beauty」では11月25日、「ふじ」では10月9日、「紅玉」では10月22日および「王林」では12月5日であった。「王林」では12月17日から、「ふじ」および「紅玉」では12月29日から、「Rome Beauty」では2015年1月14日から萌芽率が増加し始めた。萌芽率が100%に達した時期は、「王林」では12月29日、「ふじ」および「Rome Beauty」では2015年1月14日であった。「紅玉」は、2015年1月14日以降、100%に近い萌芽率を示した。

2014年の萌芽所要日数が30日に達した時期は、「Rome Beauty」では11月21日またはそれ以前で、「ふじ」では10月9日、「紅玉」では10月22日および「王林」では12月5日

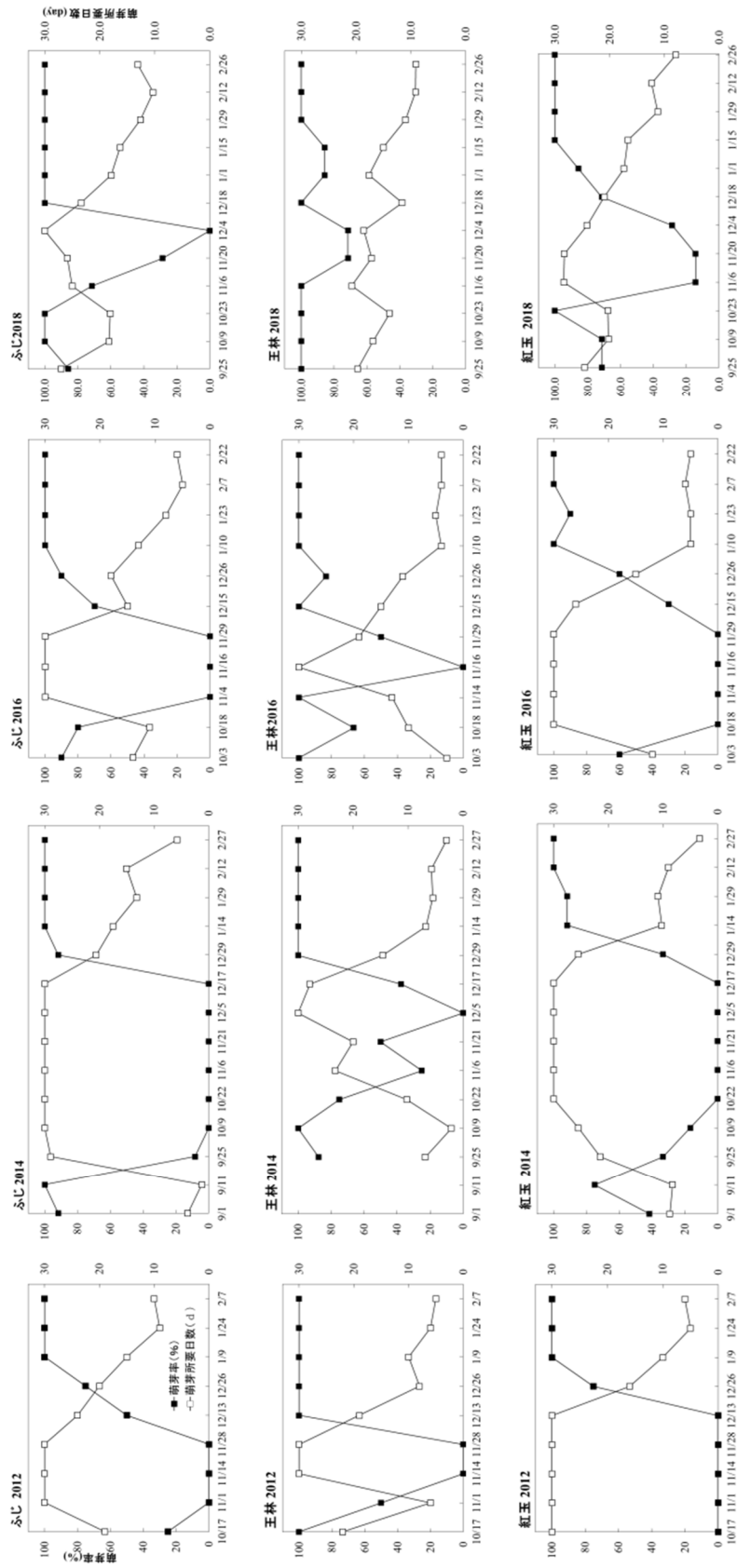
であった。‘王林’では12月17日から、‘ふじ’、および‘紅玉’では12月29日から、‘Rome Beauty’では1月14日から萌芽所要日数が減少し始めた。‘王林’、‘紅玉’および‘Rome Beauty’では1月14日以降に、‘ふじ’では1月29日以降に萌芽所要日数が一時的に横ばいに推移し、その後さらに減少した。

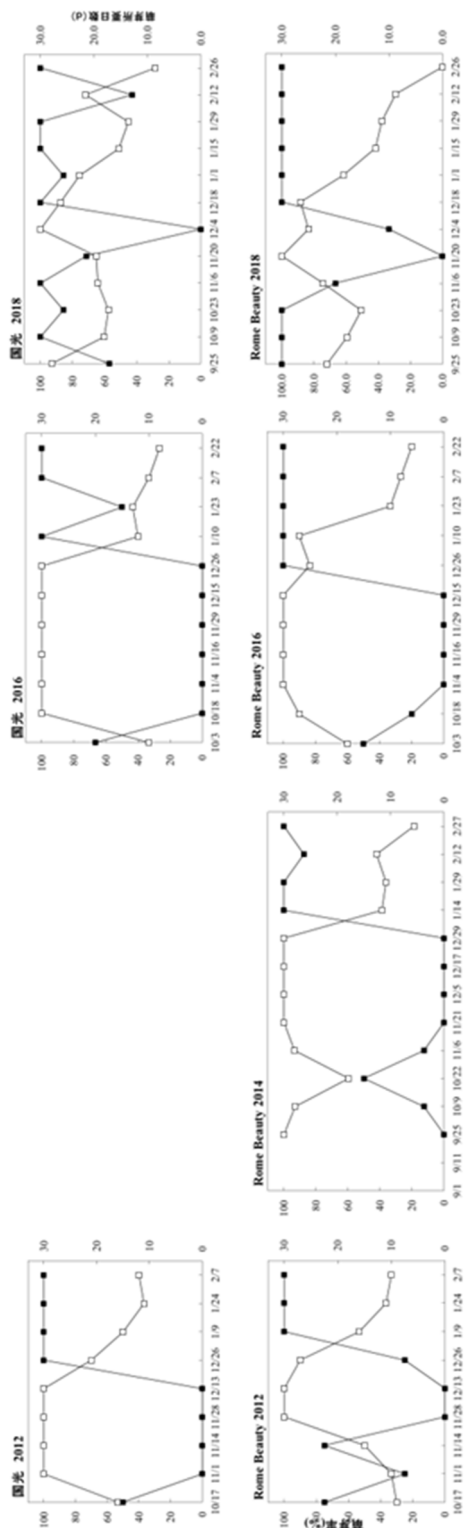
2016年の萌芽率が0%まで減少した時期は、‘紅玉’および‘国光’では10月18日、‘ふじ’および‘Rome Beauty’では11月4日、‘王林’では11月16日であった。‘王林’では12月29日、‘ふじ’および‘紅玉’では12月15日に萌芽率が増加し始め、‘王林’では12月15日、‘ふじ’と‘紅玉’では2017年1月10日に萌芽率が100%に達した。‘Rome Beauty’および‘国光’の萌芽率は、それぞれ12月26日および2017年1月10日に増加し、100%に達した。

2016年は‘紅玉’および‘国光’では10月18日、‘ふじ’および‘Rome Beauty’では11月4日、‘王林’では11月16日に萌芽所要日数が30日に達した。‘王林’では11月29日から、‘ふじ’および‘紅玉’では12月15日から、‘Rome Beauty’では12月26日から、‘国光’では1月10日から萌芽所要日数が減少し始めた。萌芽所要日数は‘王林’および‘紅玉’では1月10日以降、横ばいに推移し、‘国光’では1月10日以降一時的に横ばいに推移し、その後さらに減少した。‘Rome Beauty’の萌芽所要日数は1月23日以降、減少程度が緩やかになった。‘ふじ’の萌芽所要日数は2月7日以降、横ばいに推移した。

2018年の萌芽率が0%まで減少した時期は、‘Rome Beauty’では11月20日、‘ふじ’および‘国光’では12月4日であった。‘王林’および‘紅玉’では、萌芽率が0%まで減少した時期はなかったが、‘紅玉’では11月6日および11月20日、‘王林’では11月20日および12月4日に最低値を示した。‘Rome Beauty’および‘紅玉’では12月4日、‘ふじ’、‘王林’および‘国光’では12月18日に萌芽率が増加し始めた。‘ふじ’、‘王林’、‘国光’および‘Rome Beauty’では12月18日、‘紅玉’では2019年1月15日に萌芽率が100%に達した。

2018年の‘Rome Beauty’では11月20日、‘ふじ’および‘国光’では12月4日に萌芽所要日数が30日に達した。‘王林’および‘紅玉’では、萌芽所要日数が30日に達した時期はなかったが、‘紅玉’では11月6日および11月20日に、‘王林’では11月6日に最高値を示した。‘王林’では11月20日から、‘紅玉’および‘Rome Beauty’では12月4日から、‘ふじ’および‘国光’では12月18日から萌芽所要日数が減少し始めた。萌芽所要日数は‘紅玉’および‘Rome Beauty’では2019年2月26日まで減少し続け、‘ふじ’および‘王林’では2月12日以降横ばいに推移した。‘国光’では2019年1月29日まで減少後、一時的に増加し、再び減少した。





第 4.5 図 リンゴ 5 品種における 3 または 4 年間の
 秋季から冬季までの発芽率および萌芽所要日数の変化

3) リンゴ5品種における各休眠段階の時期および期間ならびに自発休眠打破に必要な低温要求

2018-2019年は萌芽率が0%の期間が他の3年間よりも短くなり、‘王林’、‘紅玉’では萌芽率が100%を示す期間はなかった。また、2018-2019年は萌芽所要日数が30日を示す期間は他の3年間よりも短くなり、‘王林’および‘紅玉’では萌芽所要日数が30日を示す期間はなかった。このように、2018-2019年の水挿し試験では、他の3年間よりも各品種の休眠が浅くなっているように見えた。この点に関して、水挿し試験における光源が、2012-2013年、2014-2015年および2016-2017年は蛍光灯であったのに対し、2018-2019年は高圧ナトリウムランプであり、両光源の光質が異なること、また高圧ナトリウムランプは蛍光灯よりも熱を放ちやすいことから、2018-2019年の水挿し試験の結果が他の3年間と異なった理由は年次間差というよりは光源の影響であると判断した。そこで、以下の考察では2018-2019年の結果は除外することにする。

第4.5図に示した萌芽率と萌芽所要日数から、2012-2013年、2014-2015年および2016-2017年におけるリンゴ5品種の各休眠段階の完了日を推定した(第4.1表)。調査開始日には多くの品種で既に条件的休眠期が完了し、自発休眠導入期に入っていた。2年間または3年間の平均値で比較すると、自発休眠導入期の完了日は‘紅玉’の10月20日が最も早く、次いで‘ふじ’および‘国光’の10月25日であった。‘Rome Beauty’および‘王林’の自発休眠導入期の完了日は、それぞれ11月17日および11月13日であった。

自発休眠最深期は2年間または3年間の平均値で11~12月に完了し、13~56日間続いた。‘王林’の自発休眠最深期の完了日は最も早く11月26日で、次いで‘ふじ’の12月4日、‘紅玉’の12月9日であった。‘国光’と‘Rome Beauty’の自発休眠最深期の完了日は最も遅く12月19日であった。‘王林’の自発休眠最深期が最も短く13日間であり、次いで‘Rome Beauty’の31日間であった。‘ふじ’、‘紅玉’および‘国光’の自発休眠最深期は

長く、それぞれ 47 日間、52 日間および 56 日間であった。

自発休眠覚醒期は、2 年間または 4 年間の平均値で 12 月～翌年 1 月に完了し、14～23 日間続いた。‘王林’の自発休眠覚醒期の完了日が最も早く、12 月 13 日であり、次いで‘ふじ’の 12 月 19 日であった。‘紅玉’、‘国光’および‘Rome Beauty’の自発休眠覚醒期の完了日は遅く、それぞれ翌年 1 月 1 日、1 月 2 日および 1 月 6 日であった。‘ふじ’および‘国光’の自発休眠覚醒期が最も短く 14 日間で、次いで‘王林’の 17 日間、‘Rome Beauty’の 18 日間であった。‘紅玉’の自発休眠覚醒期が最も長く 23 日間であった。‘ふじ’、‘王林’、‘紅玉’、‘国光’および‘Rome Beauty’の自発休眠打破に必要な CU 積算は、2 年間または 3 年間の平均値でそれぞれ 930、831、1,133、1,197 および 1,173 であった。

第4.1表 リンゴ5品種における各休眠段階の完了日および自発休眠打破に必要な

CU積算

品種	年	条件的休眠期	自発休眠期			自発休眠打破所要 CU ^v
		完了日 ^z	導入期完了日 ^y	最深期完了日 ^x	覚醒期完了日 ^w	
ふじ	2012 - 2013	before 10/17	11/1 —	11/28 (27) ^u	12/13 (15)	779
	2014 - 2015	9/25	10/9 (14)	12/17 (69)	12/29 (12)	1,026
	2016 - 2017	before 10/3	11/4 —	11/29 (25)	12/15 (16)	985
	Average	—	10/25	12/4 (47)	12/19 (14)	930
王林	2012 - 2013	not judged	11/14 —	11/28 (14)	12/13 (15)	779
	2014 - 2015	10/22	11/21 (30)	12/5 (14)	12/29 (24)	1026
	2016 - 2017	10/18	11/4 (17)	11/16 (12)	11/29 (13)	689
	Average	—	11/13 —	11/26 (13)	12/13 (17)	831
紅玉	2012 - 2013	before 10/17	before 10/17 —	12/13 (57+) ¹	12/26 (13)	966
	2014 - 2015	9/25	10/22 (27)	12/17 (56)	1/14 (28)	1,283
	2016 - 2017	before 10/3	10/18 —	11/29 (42)	12/26 (27)	1,151
	Average	—	10/20 (27)	12/9 (52)	1/1 (23)	1,133
国光	2012 - 2013	before 10/17	11/1 —	12/13 (42)	12/26 (13)	966
	2014 - 2015	—	— —	— —	— —	—
	2016 - 2017	before 10/3	10/18 —	12/26 (69)	1/10 (15)	1,428
	Average	—	10/25 —	12/19 (56)	1/2 (14)	1,197
Rome Beauty	2012 - 2013	not judged	11/28 —	12/13 (15)	1/9 (27)	1,074
	2014 - 2015	not judged	11/21 —	12/29 (38)	1/14 (16)	1,293
	2016 - 2017	before 10/3	11/4 —	12/15 (41)	12/26 (11)	1,151
	Average	—	11/17 —	12/19 (31)	1/6 (18)	1,173

^z 条件的休眠期の完了日は、自発休眠期導入期の開始日直前のサンプリング日とした。

^y 自発休眠導入期の完了日は、自発休眠最深期の開始日直前のサンプリング日とした。

^x 自発休眠最深期の完了日は、自発休眠覚醒期の開始日直前のサンプリング日とした。

^w 発芽率が 50%以上になったときを自発休眠覚醒期の完了日とした。

^v Guak and Nielsen (2013) の方法に従って、低温感受開始日から自発休眠期覚醒期の完了日までの CU 蓄積を計算した。

^u 括弧内の数字は各休眠段階の日数を示す。

^t (57+) は、日数が 57 日を越えていることを示す。

考察

リンゴにおける各品種の低温要求は、遺伝的に決まっている (Labuschagné et al., 2002)。しかし、本研究では、すべての品種で 2 年間または 3 年間同一樹を調査したところ、自発休眠打破に必要な CU 積算は年次により異なった。2014 年は調査していない‘国光’を除いた 4 品種で、自発休眠打破に必要な CU 積算が最も多かった。2012 年は‘王林’を除いた 4 品種で、CU 積算が最も少なく、2016 年ではその中間であった (第 4.1 表)。さらに、‘国光’を除いた 4 品種で、2014 年の自発休眠最深期および自発休眠覚醒期の完了日が、2012 年および 2016 年よりも遅かった (第 4.1 表)。2014 年における低温感受開始後から自発休眠覚醒期の完了する翌年 1 月中旬までの CU 積算の推移をみると、2012 年および 2016 年の中間であった (第 4.1 表)。リンゴ‘Gala’では低温積算が少ない場合、休眠打破に必要な CU 積算も少なくなる (Guak and Neilsen, 2013)。また、リンゴにおいて、少ない低温積算は休眠を浅くし、萌芽の再開を早くする (Malagi et al., 2015)。一方、アンズとセイヨウナシにおいて、低温が少なく低温積算の増加が遅い場合、翌春の開花が遅れることが報告されている (Campoy et al., 2010; Browning and Miller, 1992)。しかし本研究では、自発休眠の進行が遅いと自発休眠打破に必要な CU 積算が多くなったが、CU 積算の推移と自発休眠の進行および自発休眠打破に必要な CU 積算に関係はみられなかった。一方、2014 年の低温感受開始前である 9 月における CU 積算は、2012 年および 2016 年よりも少なく推移した (第 4.3 図)。これらのことから、リンゴにおける芽の休眠程度の増大は、低温に遭遇する前に始まっているのかもしれない (Hauagge and Cummins, 1991)。すなわち、低温感受開始前の気温に感応し、それがリンゴの休眠の進行に何らかの影響を与えていた可能性がある。

本研究では、すべての供試品種における各温度の低温積算に対する寄与を同一とみなし、Guak and Neilsen (2013) の方法に従ってチルユニット (CU) を算出した。しかし、‘王林’の CU 積算は 2016 年よりも 2012 年の方が多く、他の品種とは逆の年次変化を示

した（第 4.1 表）。このことから‘王林’における各温度の低温積算に対する寄与は、他の 4 品種とは異なるのかもしれない。

Guak and Neilsen (2013) は、自発休眠打破に必要な CU 積算に年次間差が生じる理由としてモデルに欠陥があることを挙げている。すなわち、Guak and Neilsen (2013) のチルモデルや Utha モデルでは、リンゴ‘Gala’の自発休眠打破に必要な低温積算に貢献する可能性がある $-2\sim-4^{\circ}\text{C}$ が考慮されていない (Guak and Neilsen, 2013)。そこで、本研究における低温感受開始からすべての品種について自発休眠覚醒期の完了する翌年 1 月 14 日までの $-2^{\circ}\text{C}\sim-4^{\circ}\text{C}$ の時間を算出すると、2012 年、2014 年および 2016 年ではそれぞれ 254 時間、282 時間および 227 時間であった。このように自発休眠打破に必要な CU 積算が最も多い 2014 年で $-2^{\circ}\text{C}\sim-4^{\circ}\text{C}$ の時間も多くなったことから、CU 積算の年次変化の原因を $-2\sim-4^{\circ}\text{C}$ の時間で説明することはできなかった。リンゴの自発休眠打破には 6°C 一定よりも昼夜温 $14^{\circ}\text{C}/6^{\circ}\text{C}$ の変温設定の方が促進的であるが、昼夜温 $17^{\circ}\text{C}/6^{\circ}\text{C}$ および昼夜温 $20^{\circ}\text{C}/6^{\circ}\text{C}$ は 6°C 一定よりも休眠打破に対して抑制的であることが報告されている (Naor et al., 2003)。また、オウトウにおいて夜温を 5°C に設定した場合、昼温 25°C 処理区では昼温 15°C 処理区よりも休眠覚醒が遅れた (工藤・野口, 2003)。高温は低温効果を打ち消すだけでなく (杉浦, 2014)、その程度によっては休眠覚醒を促進することも指摘されているため、今後は気温の日較差も考慮した自発休眠打破に必要な CU 積算の調査を検討する必要がある。

芽の休眠打破に反応する温度は、休眠段階を通して一定ではなく、樹体の生長ステージによって変化する (Parkes et al., 2020)。また、長さが同じ新梢でもその伸長停止期は同じとは限らないため (渡邊ら, 2018)、採取した新梢の伸長停止期の違いが休眠段階に影響したことも考えられる。さらに、自発休眠の長さは打破時期だけでなく、導入時期にも影響される。本研究において、2012 年および 2016 年では 10 月から調査を開始したが、調査開始前に既に自発休眠導入期が開始していた場合が多く、その開始時期を正

確に推定できなかった（第 4.1 表）。従って、自発休眠の導入に対する温度の影響の品種間差を解明するためには、遅くとも 9 月初めから調査する必要がある。また、本研究では、供試品種により台木と樹齢が異なっていた。一般に、同じ品種でも若木の低温要求は成木よりも多い（Campoy et al., 2011）。成木における樹齢が低温要求に及ぼす影響について、ドイツトウヒ（*Picea abies* (L.) Karst.）では樹齢が増加しても環境要因による自発休眠打破に大きな影響はないことが報告されている（Partanen et al., 2020）。リンゴ台木の M.7 は M.26、M.9 および MM.106 よりも自発休眠打破に必要な CU 積算が低い（Webster, 1995）。また、台木の低温要求量が満たされていて、穂木の低温要求量が不十分な場合、台木の低温要求量が穂木にかなり影響する可能性がある（Couvillon et al., 1984）。今後、同一台木、同一樹齢の樹体を供試して休眠特性を調査する必要がある。

‘王林’における 3 年間の自発休眠打破に必要な CU 積算の平均値は 831 CU であり、他の品種よりも 100~300 CU 程度少なかった（第 4.1 表）。また、‘王林’の自発休眠最深期はかなり短かった（第 4.5 図）。低温要求の少ない果樹品種の花芽は、秋季の気温を高めたとき、休眠に入らないか、または徐々に休眠に入る（Campoy et al., 2011）。‘王林’は台風の強風を受け落葉した場合に、不時開花しやすいことが知られており、この性質には‘王林’の自発休眠が浅く短いことが関係していると考えられる。ブドウでは、自発休眠の最深期以外の時期であれば、薬剤処理によって自発休眠を打破させることができる（Vergara and Pérez, 2010）。これらのことから、‘王林’は低温要求が少ないので冬季に温暖な地域での栽培に適しているだけでなく（Ruiz et al., 2018）、温度処理や摘葉によって休眠を省略させ開花日を早める作型に利用できる可能性がある。

‘紅玉’、‘国光’および‘Rome Beauty’の自発休眠打破に必要な CU 積算の平均値は、それぞれ 1,133 CU、1,197 CU および 1,173 CU で、他の 2 品種よりも多かった。また、‘紅玉’、‘国光’および‘Rome Beauty’の自発休眠覚醒の完了日は 1 月で他の 2 品種よりも遅かった（第 4.1 表）。これらの結果は、これらの 3 品種は自発休眠打破により多くの低温

積算を必要とすることを示している。

‘ふじ’、‘紅玉’および‘国光’の自発休眠最深期はいずれも 50 日程度あり、他の品種より長かった（第 4.1 表）。その中で‘ふじ’および‘国光’を比較すると、‘国光’の自発休眠最深期が‘ふじ’よりもやや長かったが、自発休眠最深期の開始日と自発休眠覚醒期間は 14 日で同じであり、両品種の休眠パターンは似ていた（第 4.1 表）。‘紅玉’は‘ふじ’および‘国光’よりも自発休眠最深期の開始が早く、覚醒期が長かった（第 4.1 表）。‘Rome Beauty’は自発休眠最深期に入る時期が最も遅かった（第 4.1 表）。‘王林’の自発休眠最深期に入る時期も‘Rome Beauty’とほぼ同じであったが、‘Rome Beauty’の自発休眠最深期の期間は‘王林’の 2 倍以上長く、両品種の休眠特性は違いが明瞭であった（第 4.1 表）。

‘Rome Beauty’は、インドネシアの高地において条件的休眠期の摘葉によって二期作されている（Janick, 1974; 湯田ら, 1981）。本研究では、各品種の条件的休眠期の完了日を明確に示すことはできなかったが、‘Rome Beauty’は自発休眠導入期の完了日が遅く、つまり自発休眠最深期に入る時期が遅かった（第 4.1 表）。自発休眠導入期は摘葉後、環境条件が適していればある程度萌芽を示す時期であるので、‘Rome Beauty’のように自発休眠最深期に入る時期が遅い品種は摘葉を利用した二期作に適していると思われる。これらのことから、‘Rome Beauty’や‘王林’は日本においても加温施設と摘葉を組み合わせた栽培体系を確立すれば二期作が可能になるかもしれない。

摘葉を利用した二期作では、摘葉時期が早すぎると頂芽が萌芽しても開花しないことから（Janick, 1974）、摘葉を利用した二期作に適した品種の特性として、摘葉時に花芽が十分に発達していることも重要である。自発休眠最深期に入る時期が遅いという特性をもつ品種では、摘葉を利用した二期作において摘葉時期を遅くすることができるため、花芽の発育期間をより長く確保できるので二期作にとって有利な特性と考えられる。今後、品種ごとの休眠特性と花芽分化ステージの関係を解明することにより、摘葉を利用した二期作により適した品種を選定することができると考えられる。

自発休眠の導入やその深さ、自発休眠後の生長速度には気温が大きく影響する (Malagi et al., 2015 ; Mohamed, 2008)。自発休眠最深期の開始日、完了日および自発休眠覚醒期の完了日について、‘国光’はいずれの暦日でも年次間差が最も小さかった (第 4.1 表)。ただし、‘国光’については 2014 年に調査しておらず、また、他の品種の 2014 年の自発休眠の最深期および覚醒期の完了日が 2012 年および 2016 年よりも遅かった (第 4.1 表) ことから、‘国光’の休眠パターンが安定しているとは断定できなかった。‘王林’は自発休眠最深期間の年次間差が最も小さく、‘ふじ’は最も大きかった (第 4.1 表)。また、自発休眠覚醒期間の年次間差は、‘ふじ’および‘国光’で最も小さく、‘紅玉’および‘Rome Beauty’で大きかった (第 4.1 表)。このように、気温の影響を受けやすい休眠段階は品種により異なることがわかった。

本研究では、リンゴ 5 品種の休眠段階の推移に加え、それらに対する気温の影響も示すことができた。また、低温要求が少なく自発休眠最深期が短い品種、または自発休眠最深期に入る時期が遅い品種が摘葉を利用した二期作に適していることが示唆された。今後、新たな作型の開発や育種年限を短縮するためには、品種ごとの条件的休眠期の完了日および自発休眠最深期の開始日と花芽分化ステージとの関係を解明し、さらに、それらに及ぼす気温の影響についても調査する必要がある。

総合考察

木本植物であるリンゴは、播種してから初開花まで7~9年の幼若相を経過後、初めて花成刺激に反応可能になる過渡相（相転換期）を経て、毎年安定して花成が起こる成熟相へと移行する。この長い年限が、育種や相転換などの生理的研究の防げとなっている。Kotoda et al. (2006) は、リンゴで *MdTFL1* の発現を低下させた組み換え体を作成し、温室内で接ぎ木後8か月で開花させた。また、Sasaki et al. (2011) は、*MdTFL1* を導入した ALSV をリンゴに接種し、接種後約2か月で花芽形成させた。このように形質転換技術やウイルスベクターによりリンゴの早期開花が可能である。さらに、リンゴでのゲノム編集技術が確立されたことから (Nishitani et al., 2016)、近い将来、ゲノム編集技術によるリンゴの早期開花も可能になるだろう。しかし、形質転換技術は安全性評価等の問題があるため、現時点ですぐに生産現場で利用できる技術ではない。なお、ウイルスベクターとゲノム編集技術により作出された作物は安全性評価の課題が少ないため、一般の生産現場での栽培が可能になっている。しかしながら、いずれの手法も特殊な設備と技術を必要とすることから、その利用は限定的で、従来のすべての交雑育種に取って代わることはないだろう。したがって、現在においても交雑育種の効率化は非常に重要な課題である。

相転換の研究を進展させるためには、再現性のある育苗システムによる正確な相転換時期の特定が必須である。しかし、リンゴ栽培種はヘテロ性が高いため、相転換の試験に遺伝子型が揃った実生集団を供することができず、正確な相転換時期を把握することは不可能である。そこで、リンゴの近縁種でアポミクシス（無配偶生殖性）を有する *M. hupehensis* の実生集団は遺伝子型が完全に同じであり、上記の課題を解決する非常に有効な材料となり得る。Zimmerman (1971) は *M. hupehensis* の実生を加温、長日条件の温室で土耕栽培し、発芽から12か月で開花させている。また、Zimmerman (1972)

は、*M. hupehensis* は樹高 1.8m~2m、主幹節数 75 節~122 節で幼若相から成熟相へ移行することを報告した。さらに、*M. hupehensis* 実生の土耕栽培では初開花の年次にかかわらず、樹高 250cm に達すれば相転換することが示されている（小森ら，2017）。このように、リンゴ実生の相転換を早めるためには、生長速度を早め、早期に樹高 200cm 以上にまで到達させることが重要であると考えられる。一般に、水耕栽培は土耕栽培よりも生育の早いことが知られている。そこで本研究では、*M. hupehensis* の実生を水耕栽培し、より早期に相転換する再現性のある栽培システムを作ることを目的に、25°C定温、光源に高圧ナトリウムランプを用いた 24 時間日長の恒温室で水耕栽培における培養液の条件と早期開花に及ぼす影響を検討した。培養液には水耕栽培で利用される市販の肥料であるハイポニカおよびハイポネックスを用いた。ハイポネックス 500 倍処理区が、生育が良くかつ枯死する個体が多かったため、リンゴ実生の水耕栽培に適していると考えられた。ハイポニカ 333 倍処理区およびハイポネックス 333 倍処理区の各 1 樹は初期生育の不良で枯死したが、いずれも高濃度の肥料を与えた処理区であった。水耕栽培開始時は培養液の肥料濃度を低く設定し、実生の生育に伴い肥料濃度を徐々に高くすることでより実生の生育速度を促進できた可能性がある。また、リンゴ実生の相転換では経験的に、樹高だけでなく側枝も含めた個体の総生長量が大きいほど相転換時期が早くなることが知られている。しかし、本研究では、個体の総生長量が大きいと主幹の生長が抑制され、結果的に樹高が低下した。したがって、相転換の促進には、できるだけ短期間で樹高を増加させ、主幹を肥大させるために側枝の剪定が必要であると考えられた。

相転換と植物ホルモンの関係を解明するための供試材料として、先述のように恒温室において *M. hupehensis* 実生を水耕栽培した。57 個体のうちの一個体は播種から 9 か月 20 日後に開花していたと推定された。その後、播種から 12 か月後までに他の個体にも開花が認められた。開花した個体は 57 樹中 15 樹であり、樹高が 240cm 以上の個体に限定すると開花した個体は 23 樹中 13 樹であった。これまでの報告と同様に、樹高が

200cm 以上で相転換したが、樹高 200~240cm の開花率は低かった。これは未開花樹の幹周の肥大が開花樹よりも劣っていたことが原因であると考えられた。今後さらに幹周の太い個体の生育特性を把握し、側枝のせん定以外に主幹を肥大させる育成法について検討する必要があると考えられた。光環境の悪かった個体は樹高が高くても開花しにくかったため、光環境の均一化を図ることで相転換率をより高めることができると考えられた。また、本研究では光源に高圧ナトリウムランプを用いたが、光源の種類によって光の強さだけでなく、光の波長も異なる。果樹の生殖生長および栄養生長を促進する光の波長はそれぞれ異なるため (Ito et al., 2014 ; 門脇ら, 2017)、今後光源の種類が *M. hupehensis* 実生の相転換に及ぼす影響についても調査する必要がある。

リンゴ実生は遺伝的な背景が揃っていないこと、正確な相転換時期が不明なことから、相転換の生理機構はこれまで未解明であった。Xing et al. (2014) は、すでに相転換している 6 年生 *M. hupehensis* 実生の成熟相および幼若相の部位から葉を採取し、葉中のオーキシシン、ジベレリンおよびアブシジン酸のレベルを比較している。しかし、この方法では、リンゴ実生で初めて花成が認められる相転換時の植物ホルモン動態は分からない。*M. hupehensis* 実生の相転換時の植物ホルモンの変化を明らかにすることができれば、植物生長調節剤により人為的に相転換を誘導し、より確実に早期に相転換させる育苗システムの確立に資することができると考えられる。そこで、前述の恒温室で水耕栽培した *M. hupehensis* 実生において、相転換すると予想された主幹の節位とその前後の新梢先端部における成葉中の植物ホルモン量の変化を調査した。供試した *M. hupehensis* 実生 8 個体のうち 4 個体は、成葉の採取後、約 2 か月弱で開花した。開花樹の主幹の節位が 70 から 90 節まで増加したときの主幹先端部の成葉中 ABA 濃度の減少が相転換と関係していることが示唆された。また、未開花樹の成葉中の GA₄ 濃度は、主幹の節位が 70 および 90 節では開花樹と差がなかったが、主幹の節位が 110 節になったとき増加し、開花樹より高い傾向がみられた。このことから、GA₄ 濃度が低いことが相転換に関

係することが推察された。これらの結果は、Xing et al. (2014) がすでに相転換している 6 年生 *M. hupehensis* 実生の成熟相および幼若相の部位から葉の植物ホルモンを調査した結果と同じ傾向であった。サイトカイニンの Z、ZR、iP および iPA 濃度も開花樹と未開花樹の間に差はなく、相転換とサイトカイニンの関係は認められなかった。以上の結果から、ジベレリン合成阻害剤の SADH はリンゴ実生の開花を早めるが (Zimmerman, 1972)、ABA 合成阻害剤の散布処理も相転換を早期化および安定化させる可能性がうかがわれる。なお本試験では、同一個体における新梢先端部の植物ホルモンを経時的に調査したため、植物ホルモンの測定部位が葉のみであった。今後は、芽および茎の植物ホルモンと相転換との関係も調査する必要がある。

育種年限の短縮には、相転換した実生を花芽分化後なるべく早く開花させることも必要である。花成・開花を自在に制御できるようになれば、育種における 1 世代に要する時間の短縮だけでなく、花成・開花・果実肥大の研究を時期にとらわれずに実施できるようになる。通常の栽培条件では、リンゴは 6 月頃に花芽分化し、花芽は落葉期まで発達する。その後、休眠を経て翌春開花する。この過程を短縮するためには、花芽分化・発育と休眠に関わる生理機構を解明する必要がある。しかし、栽培品種では、枝により花芽分化の有無や時期が大きく異なるため、条件の揃った材料を得ることが難しい。そこで、本研究では花芽着生が非常によく、かつ規則的である‘Snowdrift’を用いて、同時期に伸長停止した新梢の花芽分化・発育と休眠に関わる植物ホルモンを調査した。

水挿し実験の結果から、‘Snowdrift’は新梢伸長停止 6 週後に条件的休眠導入期に入っていることが推測された。伸長停止 8 週後 (8 月 7 日) に採取した新梢の腋芽の一部は、水差し試験中に開花した。また、同時期のいずれの芽でも ABA と GA₄ 濃度は低かった。したがって、花芽分化後も芽の植物ホルモン動態を低 ABA および低 GA₄ 濃度に維持することができれば、花芽分化後の休眠を省略し、開花を誘導させることができると考えられた。Watanabe et al. (2018) は、‘Snowdrift’の条件的休眠期における萌芽誘導は、BA

の単一処理よりも BA と ABA 合成阻害剤を混合処理した方が効果的であることを示した。本研究結果から、BA と ABA 合成阻害剤に加えて、ジベレリン合成阻害剤の混合処理により、条件的休眠期の萌芽誘導率をさらに高めることができると考えられた。

新梢伸長停止 1 週後の頂芽における高濃度の ABA が、間接的にその後の花芽分化の進行に影響を与えたことが推察された。いずれの部位の芽でも GA₄ 濃度は新梢伸長停止 1 週後に最も高く、その後新梢伸長停止 4 週間まで減少したことから、芽中の GA₄ 濃度の減少が花成を促進すること示唆された。しかし、ABA および GA₄ とともに、これらの濃度と芽の部位ごとの花芽分化ステージとの関係はみられなかった。同様にサイトカイニンの Z、ZR、iP および iPA 濃度も花芽分化との関係はみられなかった。

相転換および花芽形成と植物ホルモンとの関係を調査した実験では、それぞれの新梢先端部の成葉および芽の植物ホルモンを測定した。植物ホルモンの測定部位が異なるものの、相転換および花芽形成はいずれも低 ABA 濃度および低 GA₄ 濃度により促進される傾向があった。本研究では、恒温室内で栽培した *M. hupehensis* 実生が恒温室内で相転換し、花芽分化後開花した。したがって、恒温室内は、*M. hupehensis* 実生がいつでも花芽分化できる環境条件であったことがわかる。このため、同条件の恒温室内で *M. hupehensis* 実生に対して低 ABA 濃度および低 GA₄ 濃度を再現する植物生長調節剤を処理することができれば、相転換と花芽分化を同時に促進できる可能性がある。

インドネシア西部ジャワの高地では、リンゴ‘Rome Beauty’の収穫の 1 か月後にすべての葉を摘み取り、強制的に萌芽させ、年 2 回の収穫を可能にしている (Janick, 1974; 湯田ら, 1981)。このことから、花芽を強制的に萌芽させるための摘葉の適期は、結果枝に花芽が分化し、かつ花芽が条件的休眠期の状態のときであると推察される。従って、我が国においてもリンゴの休眠特性を把握しリンゴ樹を自発休眠開始前の条件的休眠期に開花誘導できれば (Watanabe et al., 2018)、加温や補光可能なハウス内で従来とは異なる時期に果実を収穫することができるだろう。そこで、国内におけるリンゴの主要

品種に加え、インドネシアでリンゴの二期作に使用されている‘Rome Beauty’ (Janick, 1974; 湯田ら, 1981) を含む 5 品種の休眠特性と低温要求を同一圃場において 3 または 4 年間調査した。その結果、‘王林’のように低温要求が少なく自発休眠最深期が短い品種、または‘王林’および‘Rome Beauty’のように自発休眠最深期に入る時期が遅い品種が摘葉を利用した二期作に適していることが示唆された。

本研究において、恒温室内で栽培した *M. hupehensis* 実生は、25°C、24 時間日長条件下で花芽分化後、開花した。播種後約 10 か月間は水耕栽培で、新梢伸長停止後は土耕栽培へ移行した。このとき、*M. hupehensis* 実生はほとんどの葉が落葉し、その後開花した。リンゴ実生を 25°C、24 時間日長で栽培し続けた場合、その休眠がどのように推移するのか不明であるが、新梢伸長停止後落葉により萌芽誘導されたことから新梢伸長停止時は条件的休眠期であったと考えられる。このため、*M. hupehensis* 実生は恒温室内で水耕栽培し続けても相転換し、花芽分化後全摘葉することにより萌芽・開花を誘導できることが推察された。

摘要

果樹は幼若相が長く、リンゴの場合播種から開花までに 7~9 年を要するため、品種育成に約 20 年もの長い年月がかかってしまう。果樹の育種年限を短縮するためには、まず幼若相を短縮する必要がある。幼若相を 2 年程度で終了させられれば、品種育成の期間を大幅に短縮することができる。また、育種年限の短縮には、相転換した実生を花芽分化後、休眠期間を省略し、なるべく早く開花させることも必要である。花成・開花を自在に制御できるようになれば、育種における 1 世代に要する時間の短縮だけでなく、花成・開花・果実肥大の研究も時期にとらわれずに実施できるようになる。そこで本研究では、リンゴ実生を早期に相転換させ開花誘導する技術開発の基礎的資料を得るため、*M. hupehensis* 実生を早期に相転換、開花誘導する育成法の検討、相転換に関与する内生植物ホルモンの解析、リンゴ‘Snowdrift’の花芽分化に関与する内生植物ホルモンの解析、花芽分化限界時期の把握、ならびにリンゴの休眠特性と低温要求について調査した。

1. リンゴ実生を早期に相転換させるための育成法の検討

1) 水耕栽培における培養液の検討

リンゴの近縁種でアポミクシス（無配偶生殖性）を示す *M. hupehensis* の実生を恒温室で水耕栽培し、早期に相転換する再現性のある栽培システムを作ることを目的に、水耕栽培における培養液の条件と早期開花に及ぼす影響を検討した。その結果、ハイポネックス 500 倍液が水耕栽培に適していた。恒温室で約 10 か月間水耕栽培し、土耕栽培へ移植後、自然環境で栽培した。播種後約 13 か月で樹高 201.5cm の頂端に開花した個体が認められた。また、相転換の促進にはできるだけ短期間で樹高を増加させ、主幹を肥大させるために側枝の除去が必要であると考えられた。

2) 水耕栽培による早期相転換の検討

相転換と植物ホルモンの関係を解明するための供試材料として、恒温室において *M. hupehensis* 実生を前述の培養液で水耕栽培した。完全人工環境下で水耕栽培し、播種から 10~12 か月で樹高 240cm 以上の個体の約半数を相転換、開花させることができた。また、光環境の均一化を図ることで相転換率をより高めることができると考えられた。

2. リンゴ実生の相転換に関与する内生植物ホルモンの解析

M. hupehensis 実生の初花成する相転換時の葉における植物ホルモン量の変化を未開花樹と比較した。開花樹の主幹の節位が 70 から 90 節まで増加したときの主幹先端部の成葉中 ABA 濃度の減少が相転換と関係していることが示唆された。また、未開花樹の成葉中 GA₄ 濃度は主幹の節位が 70 および 90 節では開花樹と差がなかったが、主幹の節位が 110 節になったとき、成葉中 GA₄ 濃度が増加し開花樹より高い傾向がみられた。これらのことから、GA₄ 濃度が低いことが相転換と関係することが推察された。また、サイトカイニンの相転換に対する関与は小さいことが示唆された。

3. リンゴにおける花芽分化特性の解明

花芽着生が安定し、規則的である特性を持つ‘Snowdrift’を用いて、同時期に伸長停止した新梢の花芽分化、休眠と植物ホルモンの関係を調査した。その結果、新梢伸長停止 1 週後の頂芽における高濃度の ABA が間接的にその後の花芽分化の進行に影響を与えていることが推察された。いずれの部位の芽でも、GA₄ 濃度は新梢伸長停止 1 週後に最も高く、その後新梢伸長停止 4 週間まで減少したことから、芽中の GA₄ 濃度の減少が花成を促進することが示唆された。しかし、ABA および GA₄ とも、それらの濃度と芽の部位ごとの花芽分化ステージとの間に一定の関係はみられなかった。同様に、サイトカイニンの Z、ZR、iP および iPA 濃度についても花芽分化との間に関係はみられな

かった。

‘Snowdrift’における花芽分化限界時期を把握するため、発育期間中定期的に強剪定し発生した新梢の翌年の開花を調査した。その結果、‘Snowdrift’の花芽分化の限界時期は8月中旬であると推定された。

4. リンゴ5品種の休眠特性と低温要求の評価

リンゴ‘ふじ’、‘王林’、‘紅玉’および‘国光’とインドネシアで摘葉による二期作に使用されている‘Rome Beauty’について、自発休眠の導入期、最深期および覚醒期の把握ならびに自発休眠打破に必要なチルユニット積算を調査した。その結果から、‘王林’のように低温要求が少なく自発休眠最深期が短い品種、または‘王林’および‘Rome Beauty’のように自発休眠最深期に入る時期が遅い品種が摘葉を利用した二期作に適していることが示唆された。

以上の結果から、完全人工環境下における水耕栽培は、*M. hupehensis* 実生の早期相転換に有用であることがわかった。また、*M. hupehensis* 実生の相転換には、主幹先端部の成葉中 ABA および GA₄ 濃度の低下が関与し、サイトカイニンの関与は小さいことが示唆された。さらに、成熟相にある‘Snowdrift’では、新梢伸長停止直後の頂芽における高 ABA 濃度と、その後の頂芽および腋芽における GA₄ 濃度の減少が花芽分化を促進することが示唆された。また、‘Snowdrift’の花芽分化の限界時期は9月上旬であると推定された。摘葉を利用した二期作には、低温要求が少なく自発休眠最深期が短い品種、または自発休眠最深期に入る時期が遅い品種が適していることが推察された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なる御指導、御鞭撻を頂いた、岩手大学農学部教授 小森貞男博士、岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター助教 渡邊 学博士、弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育研究センター教授 伊藤大雄博士および山形大学農学部教授 平 智博士に感謝するとともに、御礼申し上げます。

本研究における、アブシジン酸、ジベレリンおよびサイトカイニン分析に御協力を頂いた日本大学生物資源科学部教授 窪田 聡博士に対して厚く御礼申し上げます。

調査を補助して頂いた工藤静香さん、熊谷初美さん、古川翔太さん、円井絵美さん、日々御世話をかけた寒冷フィールドサイエンス教育研究センター滝沢農場教授 由比進博士、職員の皆さん、研究室学生の皆さん、留学生の友人たち、博士課程の生活を支えて頂いた日本文部科学省、両親に対して深く感謝致します。

引用文献

- Akngan, J., H. Gemma and S. Iwahori. 1995. Flower bud formation in Japanese pear trees under adverse conditions and effects of some growth regulators. *Jpn. J. Trop. Agr.* 39: 1-6.
- Aldwinckle, H. S. 1975. Flowering of apple seedlings 16-20 months after germination. *HortSci.* 10: 124-126.
- Atay, A. N. 2020. Deciphering morpho-agronomic determinants of the juvenile-mature phase change in apple progenies. *Sci. Hortic.* 259: 108847.
- 伴野 潔, 林 真二, 田辺賢二. 1982. ニホンナシにおける花芽形成の品種間差異と内生生長調節物質との関係. *園学雑.* 54: 15-25.
- Bertelsen, M. G., D. S. Tustin and R. P. Waagepetersen. 2002. Effects of GA₃ and GA₄₊₇ on early bud development of apple. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 77: 83-90.
- Browning, G. and J. M. Miller. 1992. The association of year-to-year variation in average yield of pear cv. Conference in England with weather variables. *J. Hort. Sci.* 67: 593-599.
- Buban, T. and M. Faust. 1982. Flower bud induction in apple trees: internal control and differentiation. *Hort. Rev.* 4: 174-203.

- Bubán, T. 1996. Flower development and formation of sexual organs Floral biology of temperate zone fruit trees and small fruits. Akadémiai Kiadó, Budapest, 3-54.
- Callejas, R. and F. Bangerth. 1997. Is auxin export of apple fruit an alternative signal for inhibition of flower bud induction. International Symposium on Plant Bioregulation in Fruit Production, 463: 271-278.
- Campoy, J. A., D. Ruiz and J. Egea. 2010. Effects of shading and thidiazuron + oil treatment on dormancy breaking, blooming and fruit set in apricot in a warm-winter climate. Sci. Hortic. 125: 203-210.
- Campoy, J. A., D. Ruiz and J. Egea. 2011. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: a review. Sci. Hortic. 130: 357-372.
- Campoy, J. A., D. Ruiz, L. Alderman, N. Cook and J. Egea. 2012. The fulfilment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: an approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa). Eur. J. Agron. 37: 43-55.
- Cline, M. G. 1994. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. Physiol. Plant. 90: 230-237.
- Cooke, J. E. K., M. E. Eriksson and O. Junttila. 2012. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. Plant, cell & environment 35:

1707-1728.

Couvillon, G. A., M. Magnani and C. Freire. 1984. Rootstock influences the chilling requirement of 'Rome Beauty' apple in Brazil. *HortScience* 19: 255-256.

Crabbé, J. and P. Barnola. 1996. A new conceptual approach to bud dormancy in woody plants. p. 83-113. In: G. A., Lang (ed.) *Plant dormancy: physiology, biochemistry and molecular biology*. CAB International, Wallingford, UK..

Fan, S., D. G. Bielenberg, T. N. Zhebentyayeva, G. L. Reighard, W. R. Okie, D. Holland and A. G. Abbott. 2010. Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). *New Phytol.* 185: 917-930.

Faust, M. 1989. *Physiology of temperate zone fruit trees*, 169-234.

福井博一, 増田哲男, 今河 茂, 田村 勉. 1984. リンゴの花芽分化に及ぼす果実発育期の温度の影響. *北海道大学農学部邦文紀要* 14: 159-165.

Funes, I., X. Aranda, C. Biel, J. Carbó, F. Camps, A.J. Molina, F. de Herralde, B. Grau and R. Savé. 2016. Future climate change impacts on apple flowering date in a Mediterranean subbasin. *Agric. Water Manag.* 164: 19-27.

Ghariani, K. and R. L. Stebbins. 1994. Chilling requirements of apple and pear cultivars. *Fruit Varieties J.* 48: 215-222.

Gibbs, M. A. and T. Swarbrick. 1930. The Time of Differentiation of the Flower-Bud of the Apple. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 8: 61-66.

Greene, D. W. 1993. Effects of GA₄ and GA₇ on flower bud formation and russet development on apple. *J. Hortic. Sci.* 68: 171-176.

Guak, S. and D. Neilsen. 2013. Chill unit models for predicting dormancy completion of floral buds in apple and sweet cherry. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 54: 29-36.

Guardiola, J. L., C. Monerri and M. Agusti. 1982. The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. *Physiol. Plant.* 55: 136-142.

Hackett, W. P. 1985. Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants. *Hortic. Rev.* 7:109-154.

浜本 浩, 山崎敬亮. 2013. 各種人工光源ランプの光質. *植物環境工学.* 25: 142-145.

Hanke, M. V. and H. Flachowsky. 2010. Biotechnological approaches to shorten the juvenile period in fruit trees. *International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People: International Symposium on 929.* 309-314.

Hatsuda, Y., S. Nishio, S. Komori, M. Nishiyama, K. Kanahama and Y. Kanayama. 2011. Relationship between *MdMADS11* gene expression and juvenility in apple. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 80: 396-403.

Hauagge, R. and J. N. Cummins. 1991. Age, growing temperatures, and growth retardants influence induction and length of dormancy in Malus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 116-120.

Hoad, G. V. 1983. Hormonal regulation of fruit-bud formation in fruit trees. Flowering and Fruit Set in Fruit Trees 149: 13-24.

Hänninen, H. 2016. Modelling the Ecophysiology of Seasonality. p.1-13. Springer, Dordrecht.

Igarashi, M., Y. Hatsuyama, T. Harada and T. Fukasawa-Akada. 2016. Biotechnology and apple breeding in Japan. Breed. Sci. 66: 18-33.

Ito, A., H. Yaegaki, H. Hayama, et al. 1999. Bending shoots stimulates flowering and influences hormone levels in lateral buds of Japanese pear. Hort. Sci. 34: 1224-1228.

Ito, A., H. Hayama, and H. Yoshioka. 2000. Effects of plant growth regulators and their time of application on flower bud formation of Japanese pear 'Kosui'. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 69.5: 529-535.

伊東明子. 2001. ニホンナシ長果枝の花芽形成における植物ホルモンの役割とその利用による制御技術. 植物の生長調節. 36: 80-84.

Ito, A, T. Saito, T. Nishijima and T. Moriguchi. 2014. Effect of extending the photoperiod with

low-intensity red or far-red light on the timing of shoot elongation and flower-bud formation of 1-year-old Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Tree Physiol.* 34: 534-546.

Janick, J. 1974. The apple in java. *HortSci.* 9: 13-15.

門脇芽衣子, 車 敬愛, Hnin Yin Cho, 荻原 勲. 2017. 園学研 16 (別 1): 17.

小森貞男, 谷守 (田中) 友紀, 岡田初彦, 金山喜則, 渡邊 学. 2017. 園学要旨. 平 29 東北支部: 11-12.

Kotoda, N., H. Hayashi, M. Suzuki, M. Igarashi, Y. Hatsuyama, S. Kidou, T. Igasaki, M. Nishiguchi, K. Yano, T. Shimizu, S. Takahashi, H. Iwanami, S. Moriya and K. Abe. 2010. Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like genes of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Cell Physiol.* 51: 561-575.

Kotoda, N., H. Iwanami, S. Takahashi and K. Abe. 2006. Antisense expression of *MdTFL1*, a *TFL1*-like gene, reduces the juvenile phase in apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 131: 74-81.

Königshofer, H. 1990. Polyamine content in needles, shoot-axes, buds and xylem exudates of mature spruce trees [*Picea abies* (L.) Karst.]. *J. Plant Physiol.* 136: 377-380.

Kunihisa, M. リンゴ育種研究の進展とゲノムインフォマティクス. https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/34d8b648c2178b2ceea9b9352d47cc19.pdf

- 工藤 信, 野口協一. 2003. オウトウ‘佐藤錦’の自発休眠覚醒時期と低温要求量. 山形園試研報. 15: 1-10.
- Kwon, Y. H., K. H. Shin, H. S. Park, et al. 2007. Crop load adjustment based on tree vigor for producing uniform fruits in ‘Niitaka’ pear trees. Hort. Environ. Biotechnol. 48: 109-114.
- Labuschagné, I. F., J. H. Louw, K. Schmidt and A. Sadie. 2002. Genetic variation in chilling requirement in apple progeny. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 663-672.
- Lang, G. A., J. D. Early, G. C. Martin and R. L. Darnell. 1987. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. HortScience 22: 371-377.
- Lenz, F. and A. Karnatz. 1973. The effect of GA₃, Alar and CCC on citrus cuttings. Africa Symposium on Horticultural Crops 49: 147-156.
- Liljegren, S. J., C. Gustafson-Brown, A. Pinyopich, G. S. Ditta and M. F. Yanofsky. 1999. Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. The Plant Cell 11: 1007-1018.
- Liu, J., S. Kogawa, H. Kumagai, M. Muralami, S. Komori and M. Watanabe. 2018. Effect of Defoliation on Flowering Induction, dormancy characteristics and Plant Hormone of Apples during Para-dormancy Period. 6th Plant Dormancy Symposium, Kyoto, Japan.

- Luckwill, L. C. 1974. A new look at the process of fruit bud formation in apple. Proceedings of the XIX International Horticultural Congress 3: 237-245.
- Luckwill, L. C. 1980. Hormones and the productivity of fruit trees. *Sci. Hortic.* 31: 60-68.
- Magness, J. R. 1916. The influence of summer pruning on bud development in the apple.
- Malagi, G., M. R. Sachet, I. Citadin, F. G. Herter, M. Bonhomme, J. L. Regnard and J. M. Legave. 2015. The comparison of dormancy dynamics in apple trees grown under temperate and mild winter climates imposes a renewal of classical approaches. *Trees* 29: 1365-1380.
- Marcelle, R., C. Sironval. 1963. Effect of gibberellic acid on flowering of apple trees. *Nature* 197 (4865): 405-405.
- McArthey, S. J. and S. H. Li. 1998. Selective inhibition of flowering in Braeburn apple trees with GA₃. *HortScience*. 339: 699-700.
- Meier, U., H. Graf, H. Hack, M. Hess, W. Kennel, R. Klose, D. Mappes, D. Seipp, R. Stauss and J. Streif. 1994. Phenological growth stages of pome fruit (*Malus domestica* Borkh. and *Pyrus communis* L.), stone fruit (*Prunus species*), currants *Ribes species* and strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Nachrbl. Dtsch. Pflanzenschutzd* 46: 141-153.

- Mohamed, A. K. A. 2008. The effect of chilling, defoliation and hydrogen cyanamide on dormancy release, bud break and fruiting of anna apple cultivar. *Sci. Hort.* 118: 25-32.
- Montazeran, A., A. Khadivi and A. Khaleghi. 2018. The first report: Chilling and heat requirements of seedless barberry (*Berberis vulgaris* L. var. *asperma*). *Sci. Hort.* 231: 188-193.
- Naor, A., M. Flaishman, R. Stern, A. Moshe and A. Erez. 2003. Temperature effects on dormancy completion of vegetative buds in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 636-641.
- Nishitani, C., N. Hirai, S. Komori, M. Wada, K. Okada, K. Osakabe, T. Yamamoto and Y. Osakabe. 2016. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*. 6: 1-8.
- Nocker, S.V. and S. E. Gardiner. 2014. Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Horticulture Research* 1: 1-8.
- Olien, C. W. 1987. Apomictic crabapples and their potential for research and fruit production. *HortScience*. 22: 541-546.
- 長内敬明, 岡本道夫, 小原信実. 1990. リンゴ ‘ふじ’の花芽分化期と花芽分化に及ぼす光と温度の影響. *青森県りんご試報*. 26: 159-170.
- Parkes, H., R. Darbyshire and N. White. 2020. Chilling requirements of apple cultivars grown in

mild Australian winter condition. *Sci. Hortic.* 260: 108858.

Partanen, J., R. Häkkinen, S. Sutinen, A. Viherä-Aarnio, R. Zhang and H. Hänninen. 2020. Endodormancy release in Norway spruce grafts representing trees of different ages. *Tree Physiol.* 00: 1–13. doi:10.1093/treephys/tpaa001.

Pharis, R. P. and R. W. King. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 517-568.

Rakngan, J., H. Gemma and S. Iwahori. 1995. Flower bud formation in Japanese pear trees under adverse conditions and effects of some growth regulators. *Jpn. J. Trop. Agric.* 39: 1-6.

Ramírez, H., J. Torres, A. Benavides, J. Hernández and V. Robledo. 2004. Fruit bud initiation in apple cv Red Delicious linked to gibberellins and cytokinins. *Revista de la Sociedad Química de México* 48: 07-10.

Rey, M., A. F. Tiburcio, C. Díaz-Sala and R. Rodríguez. 1994. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and in vitro reinvigorated hazel. *Tree Physiol.* 14: 191-200.

Ruiz, D., J. Egea, J. A. Salazar and J. A. Campoy. 2018. Chilling and heat requirements of Japanese plum cultivars for flowering. *Sci. Hortic.* 242: 164-169.

Sasaki, S., N. Yamagishi and N. Yoshikawa. 2011. Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using Apple latent spherical virus vectors. *Plant Methods* 7: 1-11.

杉浦俊彦. 2014. 落葉果樹の休眠と低温要求性. 施設栽培. 農業技術大系. 果樹編 8. 農文協. 東京.

田村 勉, 平田行正, 鈴木 卓, 今河 茂, 福井博一. 1987. リンゴ花芽の発育段階の判別指標としての花芽横径. *北海道大学農学部邦文紀要* 15: 152-158.

Tromp, J. 1982. Flower-bud formation in apple as affected by various gibberellins. *J. Hortic. Sci.* 57: 277-282.

Tromp, J. 1984. Flower-bud formation in apple as affected by air and root temperature, air humidity, light intensity, and day length. *Flowering and Fruit Set in Fruit Trees*. 149: 39-48.

鵜飼真澄, 菊地秀喜. 2007. 授粉専用品種の結実管理. (独) 農業・食品産業技術研究機構果樹研究所. 盛岡: 23-25.

Vergara, R. and F. J. Pérez. 2010. Similarities between natural and chemically induced bud-endodormancy release in grapevine *Vitis vinifera* L. *Sci. Hortic.* 125: 648-653.

Visser, T. 1964. Juvenile phase and growth of apple and pear seedlings. *Euphytica*. 13: 119-129.

Visser, T. 1976. A comparison of apple and pear seedlings with reference to the juvenile period.
II. Mode of inheritance. *Euphytica*. 25: 339-342.

Watanabe, M., S. Kogawa, Y. Inoda, R. Kagi, H. Kumagai, M. Murakami and S. Komori. 2018.
Induction of bud breaking and flowering during paradormancy in apple trees. *Acta. Hortic.*
1206: 169-174.

渡辺 伸, 須藤佐藏, 佐々木恵美, 安孫子裕樹, 野口協一, 佐藤健治, 工藤 信. 2006.
オウトウの薬剤による休眠打破法. *山形園試研報*. 18: 49-57.

渡邊 学, 猪田由莉, 古川翔太, 劉 嘉儀, 村上政伸, 小森貞男. 2018. リンゴ‘Snowdrift’
の新梢伸長停止期と花芽発育の関係. *園学研*. 17 (別 2): 18.

Webster, A. D. 1995. Rootstock and interstock effects on deciduous fruit tree vigour, precocity,
and yield productivity. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 23: 373-382.

Weigel, D. and O. Nilsson. 1995. A developmental switch sufficient for flower initiation in
diverse plants. *Nature* 377(6549): 495-500.

Westwood, M. N. 1988. *Temperate-zone pomology*. Timber press.

Xing, L., D. Zhang, Y. Li, C. Zhao, S. Zhang, Y. Shen, N. An and M. Han. 2014. Genome-wide
identification of vegetative phase transition-associated microRNAs and target predictions

using degradome sequencing in *Malus hupehensis*. *BMC genomics* 15: 1-22.

Yamane, H., T. Ooka, H. Jotatsu, R. Sasaki and R. Tao. 2011. Expression analysis of PpDAM5 and PpSAM6 during flower bud development in peach (*Prunus persica*). *Sci. Hortic.* 129: 844–848.

湯田 英二, 松井 弘之, 中川 昌一, 山口 五十麿, 室伏 旭, 高橋 信孝, 和田 攻次郎, 今井 哲弥. 1981. ナシ属の着果に及ぼす各種ジベレリンの施用効果. 植物化学調節研究会 研究発表記録集. 16: 35-36.

湯田英二, 宇都宮直樹, 久保田尚浩. 1981. インドネシアにおけるリンゴ栽培. 園学要旨. 昭 56 春: 154-155.

Zeng, G., C. Li, X. Zhang, Y. Teng and W. Dong. 2009. Efficient protein extraction method from apple leaves for apple proteomic analysis using two-dimensional electrophoresis analysis. *Se. Pu.* 27: 484-488.

Zhang, S., D. Zhang, S. Fan, L. Du, Y. Shen, L. Xing, Y. Li, J. Ma and M. Han. 2016. Effect of exogenous GA₃ and its inhibitor paclobutrazol on floral formation, endogenous hormones, and flowering-associated genes in ‘Fuji’ apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Physiol. Biochem.* 107: 178-186.

Zhang, X. Z., Y. B. Zhao, G. P. Wang, R. F. Chang, C. M. Li and H. R. Shu. 2008. Dynamics of endogenous cytokinins during phase change in *Malus domestica* Borkh. *Acta. Hort.* 774:

29-33.

Zhuang, W., B. Cai, Z. Gao and Z. Zhang. 2016. Determination of chilling and heat requirements of 69 Japanese apricot cultivars. *Eur. J. Agron.* 74: 68-74.

Zimmerman, R. H. 1971. Flowering in crabapple seedlings: methods of shortening the juvenile phase. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96: 404-411.

Zimmerman, R. H. 1972. Session III-Juvenility-Juvenility and flowering of fruit trees. Symposium on growth Regulators in Fruit Production 34: 139-142.

Zimmerman, R. H., W. P. Hackett and R. P. Pharis. 1985. Hormonal aspect of phase change and precocious flowering. *Encycl. Plant Physiol.* 11: 79-115.