

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05555

研究課題名(和文)低温脱馴化過程で起こるブドウの冬芽の過冷却能力低下機構の解明

研究課題名(英文) How does supercooling capability of grape buds change during a deacclimation process?

研究代表者

春日 純 (Kasuga, Jun)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：40451421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、内部の原基を過冷却させることで凍結傷害を防ぐブドウの冬芽が早春期に耐寒性を失うメカニズムの解明を試みた。十勝地域で栽培されているブドウ品種‘山幸’の冬芽は2月下旬から耐寒性を低下させるが、4月上旬にその低下速度が速くなり、5月上旬の芽吹きと共に耐寒性を失った。我々は、耐寒性を失いつつあるブドウの冬芽を観察することで、4月上旬と芽吹き時期に、それぞれ、新梢から冬芽内部へ続く道管を介した通水の開始と新規の大径の道管形成が起こることを確認した。これらの結果は、冬芽の外から原基の中への凍結の伝播が起こりやすくなるのが、この時期の段階的な冬芽の耐寒性低下をもたらすことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブドウの冬芽が芽吹きの時期に耐寒性を失うことは良く知られており、寒冷地域で栽培されるブドウでは、しばしば晩霜害が発生する。ブドウの冬芽が晩霜害を受ける際は、枝から冬芽へと凍結が伝播することは過去に報告されていたが、芽吹き前後で冬芽の耐寒性が劇的に変化する機構については未解明であった。本研究の結果は、道管を通る冬芽内への凍結の伝播しやすさの変化が冬芽の耐寒性喪失に關与することを強く示した。さらに、冬芽と隣接する枝の組織に、未同定ではあるが、凍結の伝播しやすさを決める構造物が存在することを確認した。この構造物を同定し、その特性を変えることができれば、ブドウの晩霜害の低減につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Winter buds of grapevines adapt subfreezing temperatures by supercooling. In this study, we attempted to elucidate the mechanism by which grape buds lose their freezing resistance in early spring. Winter buds of 'Yamasachi' variety grown in the Tokachi region gradually declined their freezing resistance from late February. Then, a temporal increase of the decline rate was observed in early April, and the buds lost their freezing resistance in early May at the same time with budburst. We observed that the initiation of xylem water transport from twigs to bud primordia and the formation of new vessels with larger diameter in buds occurred in early April and during budburst, respectively. These results suggest that enlargement of the ice propagation pathway from the outside to the inside of winter buds led to a stepwise decrease in freezing resistance of grape buds in early spring.

研究分野：植物生理学

キーワード：ブドウ 耐寒性 脱馴化 冬芽 過冷却 組織構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、道東や道北で新たなワイナリーが設立されるなど、北海道の醸造用ブドウ栽培地がより寒冷な地域に拡大している。これらの地域では、冬季の耐寒性が栽培品種の選択に強く影響し、また、厳冬期に高い耐寒性を示す品種であっても、耐寒性が気温の上昇に伴って低下する脱馴化の時期に高い凍霜害リスクが存在する。ブドウで凍霜害が発生するときには、初めに冬芽が傷害を受ける。しかし、ブドウだけではなく、樹木の冬芽が脱馴化の過程で耐寒性を低下させるメカニズムはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、「ブドウの冬芽が脱馴化過程でどのように耐寒性を失うか」を課題の核心をなす問いとし、その解明を目指した。氷点下温度に晒されたブドウの冬芽は、内部のシュート原基を過冷却させることで凍結を回避しており、いったんシュート原基の一部で凍結が開始すると、直ちに凍結は器官内全体に広がり、シュート原基は致命的な傷害を受ける。シュート原基の凍結は、冬芽の外から原基内への凍結の伝播、もしくは、原基内で自発的に生じる氷核形成のいずれかによってもたらされる。今回は特に、冬芽の外からの凍結の伝播に注目した。厳冬期に採取したブドウの冬芽では、冬芽と新梢の境界付近の組織が凍結の伝播を防ぐバリアとして働くと考えられている。そこで、材料として、高耐寒性種間交雑ブドウ品種「山幸」を用いて、この冬芽と新梢の境界付近の組織において、脱馴化過程で冬芽の外から原基内への凍結の伝播が起こりやすくなるような構造変化が起こるのか否か、さらに、その構造変化がどのようにブドウ冬芽の耐寒性変化に影響を与えるのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 材料と脱馴化処理：北海道池田町ブドウ・ブドウ酒研究所の圃場で栽培されている高耐寒性種間交雑ブドウ品種「山幸」を材料として用いた。屋外の圃場で起こる脱馴化過程について調べる際には、2月上旬から4月上旬まで2~4週間おきに圃場に冬芽の付いた新梢を採取し、採取した新梢は氷の上に置いて実験室まで持ち帰った。インキュベータ内での人為的な脱馴化処理には、2月上旬に採取して-7℃に設定した冷凍庫で保存した「山幸」の新梢を冷凍庫から出して用い、水を含ませたロックウールに挿して20℃に設定したインキュベータ内に最大で15日間静置することで脱馴化処理を行った。

(2) 冬芽の耐寒性評価：ブドウの冬芽は、シュート原基の過冷却が破れ、凍結する際に致命的な傷害を受ける。そこで、冬芽の耐寒性は、示差熱分析でシュート原基の過冷却が破れる際の発熱を検出することで評価した。冬芽を1つ含むように新梢の小片を切り出し、パラフィルムで冬芽の表面に熱電対の測温接点を固定した。その後、新梢の小片をプログラムフリーザで5℃/hの速度で冷却し、冷却過程で起こる冬芽の温度変化をもとに、シュート原基の凍結温度を決定した。

(3) 免疫染色による冬芽と新梢の境界付近のペクチン堆積の観察：2月上旬に採取して-7℃で保存していた新梢と15日間の脱馴化処理を行った新梢からそれぞれ冬芽を切り出し、その縦断面切片を2種類のモノクローナル抗体LM19、LM20を用いて免疫染色して蛍光顕微鏡で観察した。

(4) 新梢から冬芽へと続く道管形成の観察：圃場から採取した直後の冬芽および脱馴化処理を行った冬芽について、基部付近の横断面切片を偏光顕微鏡で観察することで二次壁を持つ細胞の存在を、基部付近の縦断面切片をフロログルシノール染色して光学顕微鏡で観察することで細胞壁にリグニンが沈着した細胞の存在を確認した。また、新梢の組織を少し残して冬芽を切り出し、新梢側からフルオレセイン溶液を20℃で16時間吸収させることで、新梢から冬芽のシュート原基への通水の有無を確認した。厳冬期に採取した冬芽については、基部の透過型電子顕微鏡観察も行った。

(5) 通水経路に存在する構造物内の微小孔径の評価：冬芽のシュート原基にフルオレセイン溶液を吸収させたものと同様の方法で分子量およそ1,500までのポリエチレングリコール(PEG)を含む溶液を吸収させた。その後シュート原基のみをカミソリ刃を用いて切り出し、そこに含まれるPEGの分子量をMALDI-TOF質量分析計によって評価した。その分子量を基に、Thybring et al. (2018) に示されている式からシュート原基内に移動したPEGの最大径を求めた。

4. 研究成果

2月上旬に-30℃程度であった圃場で生育する「山幸」の冬芽の耐寒性は、4月上旬までに-15℃程度まで低下した。20℃において人為的に脱馴化させた冬芽の耐寒性は、脱馴化前には-30℃程度だったものが処理中に徐々に低下し、脱馴化処理9日目には-7℃程度となり、処理11日目に明瞭に膨らみが観察された冬芽では耐寒性が失われた(図1)。

人為的な脱馴化前の冬芽と20℃で15日間脱馴化処理を行うことで耐寒性を失った冬芽の基部におけるペクチンの堆積を免疫染色により観察したところ、低メチルエステル化ペクチンを認識するLM19とメチルエステル化ペクチンを認識するLM20で共に脱馴化処理前後で明瞭な染



図1 20 での脱馴化処理期間と‘山幸’の冬芽の成長再開。

色性の違いは見られなかった。ブドウの冬芽では、脱馴化による耐寒性の低下に細胞壁を構成するペクチンの変化は関わらないのかもしれない。

ヨーロッパブドウ (*Vitis vinifera*) については、厳冬期に冬芽内の維管束は未分化の前形成層細胞のみで構成されており、新梢と冬芽をつなぐ道管は分化していないことで、シュート原基が新梢のアポプラストにある氷晶から隔離され、凍結ストレス下でシュート原基は過冷却をすることができるという報告がなされてきた (Ait Barka et al. 1995, Xie et al. 2018)。本研究で用いたブドウでも同様の結果が得られると思い実験を開始したが、ヨーロッパブドウと比べて耐寒性の高い種間交雑品種‘山幸’では、厳冬期に採取した冬芽でも、基部の維管束の中にすでに二次壁を持つ細胞が存在し、リグニンの沈着も見られた (Kasuga et al. 2023)。しかし、新梢から冬芽へのフルオレセイン溶液の移動は見られず、厳冬期に‘山幸’の冬芽内で見られたリグニン沈着をした二次壁を持つ細胞は、通水機能を持たないことが示唆された (図2)。透過型電子顕微鏡で冬芽の基部組織を観察したところ、二次壁を持つ細胞の内部に細胞小器官が見られ、厳冬期の冬芽内の道管要素ではまだ細胞質や細胞小器官の分解は起こっておらず、そのために通水が起こらないものと考えられた。園場で生育するブドウでは4月上旬に、20 で脱馴化処理した冬芽では処理開始から7~9日目に、新梢からシュート原基へのフルオレセイン溶液の移動が開始した (図2)。このことから、この時期に冬芽の道管が機能を獲得したものと考えられる。冬芽の耐寒性は脱馴化過程で徐々に低下したが、新梢から冬芽内部へ続く道管を介した通水の開始と同時期に、その低下速度が上昇した。この結果は、道管の通水機能獲得により冬芽の内外的凍結の伝播がしやすくなったことが、脱馴化速度の上昇に關与することを示唆している。

氷点下温度で過冷却をする樹木の冬芽において、新梢と冬芽のシュート原基との間の道管は凍結の伝播の経路となり得ることから、これまで、道管の機能獲得と共にその冬芽は耐寒性を失うと考えられてきた (Ashworth 1984)。しかし、‘山幸’の冬芽では、道管を介した冬芽内への通水が開始しても、冬芽は-7~-15程度まで過冷却状態を維持することができた (Kasuga et al. 2023)。このようなことが起こ

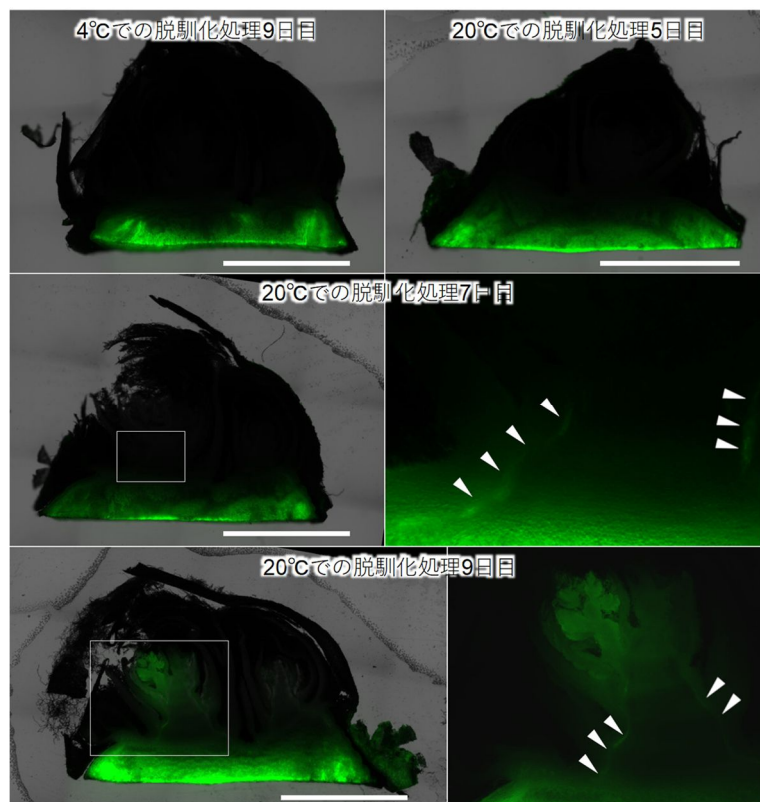


図2 フルオレセイン溶液の吸収試験による道管の通水機能の観察。厳冬期に採取した冬芽では、4 で9日間処理した冬芽や20 で5日間処理した冬芽と同様に、シュート原基内からフルオレセインの蛍光は見られなかった。矢頭は、維管束からの蛍光を示す。スケールバーは3 mm。

るためには、通水経路の途中に最大径が 10 nm 未満の孔を持つ何らかの構造物が存在する必要がある (Ashworth and Abeles 1984)。20 で脱馴化処理をした冬芽に、新梢からフルオレセインと共に蛍光色素テキサスレッドを結合した分子量がおよそ 70,000 のデキストランを吸収させた。フルオレセインと分子量 70,000 のデキストランの分子直径はそれぞれ 1 nm と 12 nm 程度である (Thybring et al. 2018)。フルオレセインの冬芽内への移動は脱馴化処理 7 日目から始まったが、処理 9 日目までデキストランの赤い蛍光は冬芽と新梢の境界の手前で止まり、冬芽内への移動は、冬芽が膨らみ始め耐寒性を失ったのと同時期の脱馴化処理 11 日以降に見られた。この結果は、新梢から冬芽内への道管を介した通水が始まってから芽吹きが起こるまでの間、通水組織内のデキストランの移動が止まった位置に水や径の小さな分子の移動は許すものの凍結の伝播を防ぐ構造物が存在することを示す。この構造物に存在する微小孔の最大径をより正確に調べるために、脱馴化処理 7 日目と 15 日目の冬芽に分子量がおよそ 1,500 までの PEG を吸わせ、単離したシュート原基から得られた抽出物を用いて質量分析を行ったところ、処理 15 日目には m/z が 1,500 程度の PEG に関連するイオンも検出されたのに対して、処理 7 日目のシュート原基の抽出物からは、 m/z が 550 ~ 650 程度のカリウム付加イオンよりも大きい PEG 関連イオンは検出されなかった。このことは、道管を介した通水経路に存在する構造物内の微小孔径の最大径は 1.5 ~ 2 nm であることを示唆している (Thybring et al. 2018)。今のところ、通水経路内で直径がおよそ 12 nm であるデキストランの移動を制限する構造物が何であるのかは明らかになっていない。現在、その同定を目指した実験を進めている。

20 で脱馴化処理を行った '山幸' の冬芽の基部において、1 つの維管束あたりに含まれる二次壁を持つ細胞の数は、脱馴化処理前から処理 11 日目まではほとんど変化は見られなかったが、処理 13 日目から有意に増加した。また、処理 13 日目以降に新たに作られた二次壁を持つ細胞は処理 11 日目までに存在していた細胞と比べて放射方向に長く、横断面切片で見られる内腔の長径は、11 日目までのものに比べて 2 倍程度にもなった。維管束内で見られる二次壁を持つ細胞は道管要素であると考えられるが、大径の道管が形成されるのとほぼ同じ時期にシュート原基内へ直径がおよそ 12 nm のデキストランの移動が見られるようになったことから、新たに形成された大径の道管は凍結の伝播を防ぐ構造物を持っておらず、内部を容易に凍結が伝播することができるために、大径の道管が形成される芽吹きの時期に '山幸' の冬芽は耐寒性を失ったのではないかと考えている。

引用文献

- Thybring E, Kymäläinen M, Rautkari L (2018) Experimental techniques for characterising water in wood covering the range from dry to fully water-saturated. *Wood Science and Technology* 52: 297-329.
- Ait Barka E, Audran JC, Brun O, Leddet C, Dereuddre J (1995) Formation et distribution de glace dans les bourgeons de *Vitis vinifera* avant et au cours de leur débourrement. *Canadian Journal of Botany* 73: 1878-1888.
- Xie X, Forney CF, Bondada B (2018) Renewal of vascular connections between grapevine buds and canes during bud break. *Scientia Horticulturae* 233: 331-338.
- Kasuga J, Kawase A, Kamigaki R, Mihara Y, Kondoh D (2023) Vessel development in compound buds of interspecific hybrid grape induced by artificial deacclimation treatments. *Physiologia Plantarum* 175: e13940.
- Ashworth E (1984) Xylem development in *Prunus* flower buds and the relationship to deep supercooling. *Plant Physiology* 74: 862-865.
- Ashworth EN, Abeles FB (1984) Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues. *Plant Physiology* 76: 201-204.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horiuchi Reiko, Arakawa Keita, Kasuga Jun, Suzuki Takashi, Jitsuyama Yutaka	4. 巻 101
2. 論文標題 Freezing resistance and behavior of winter buds and canes of wine grapes cultivated in northern Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 44 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2021.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 春日純、兼谷颯斗、東億、金谷真稀	4. 巻 32
2. 論文標題 冬季の不織布資材による被覆がブドウの周囲温度と休眠芽の凍結抵抗性に与える影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本ブドウ・ワイン学会誌	6. 最初と最後の頁 3 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Daisuke, Willick Ian R, Kasuga Jun, Livingston III David P	4. 巻 62
2. 論文標題 Responses of the Plant Cell Wall to Sub-Zero Temperatures: A Brief Update	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1858 ~ 1866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kasuga Jun, Kawase Ayumi, Kamigaki Rika, Mihara Yuka, Kondoh Daisuke	4. 巻 175
2. 論文標題 Vessel development in compound buds of interspecific hybrid grape induced by artificial deacclimation treatments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 e13940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppl.13940	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 春日 純、西 龍一郎、廻淵 凌匠	4. 巻 69
2. 論文標題 厳冬期以降のブドウの冬芽の雪中での耐寒性変化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 57～60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20585/cryobolcryotechnol.69.2_57	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂原詩織、Amaya Atucha、春日純
2. 発表標題 北海道で栽培される醸造用ブドウの冬芽の凍結環境下における脱水特性
3. 学会等名 北海道園芸研究談話会2022年度研究発表会（オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 春日純、河瀬肖美、神垣里夏、近藤大輔
2. 発表標題 摘葉処理がブドウ品種‘山幸’の果汁品質に与える影響
3. 学会等名 第67回低温生物工学会大会（オンライン）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaneya Hayato、Azuma Hakaru、Kanaya Maki、Kasuga Jun
2. 発表標題 Effects of unwoven fabric sheet cover on freezing resistance of grape buds during winter
3. 学会等名 12th International Plant Cold Hardiness Seminar（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kasuga Jun
2. 発表標題 LECTURE 6: Deep supercooling: freezing avoidance mechanisms in woody plants
3. 学会等名 12th IPCHS Course (Pre-recorded online lecture) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春日純、西龍一郎、廻淵凌匠
2. 発表標題 厳冬期以降のブドウの冬芽の雪中での耐寒性変化
3. 学会等名 第68回低温生物工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上未葉、松田愉慎、西龍一郎、春日純
2. 発表標題 ブドウの冬芽における脱馴化の進行による再馴化能力の変化
3. 学会等名 北海道園芸研究談話会2023年度研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廻淵凌匠、春日純
2. 発表標題 ブドウ冬芽の初春の耐寒性決定に關与する道管内バリア構造
3. 学会等名 北海道園芸研究談話会2023年度研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 春日純、坂原詩織
2. 発表標題 高耐寒性種間交雑ブドウの冬芽の凍結環境下における脱水特性
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帯広畜産大学植物生理学研究室ホームページ http://univ.obihiro.ac.jp/~plantphysiol/index.html 帯広畜産大学植物生理学研究室北方ぶどう情報室 http://univ.obihiro.ac.jp/~plantphysiol/grape/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 卓 (Suzuki Takashi) (30196836)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	高橋 大輔 (Takahashi Daisuke) (20784961)	埼玉大学・理工学研究科・助教 (12401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ウィスコンシン大学マディソン校			