

## ウメの休眠覚醒を制御する要因探索 ～人為的休眠制御にむけて～

京都大学大学院農学研究科 山根久代

### はじめに ～果樹のライフサイクルと休眠機構～

温帯域で栽培される落葉果樹の多くは、秋に落葉し、翌年の栄養成長の起点となる成長点を含む芽を残して越冬し、春に一斉に萌芽・開花し結実する。休眠は、樹体の成長リズムを四季の環境変化にあわせるための成長制御機構のひとつであり、冬季の凍害回避や春の一斉開花と萌芽の同時性を可能としている。さらに休眠は、翌年の開花結実や栄養成長に影響を及ぼす重要な農業形質のひとつである。また、近年の気候変動により、果樹における休眠覚醒の攪乱が問題視されていることから、休眠の機構解明は安定した果実生産をめざすうえで重要な課題のひとつである。

筆者らはこれまで、ウメを材料に休眠機構の解明を試みてきた。ウメを含む多くの落葉果樹の季節的ライフサイクルを大別すると、春から夏にかけての活発な栄養成長期と秋から冬にかけての休眠期に分けられる。京都の気象条件におけるウメのライフサイクルは以下のようである。2～3月に開花がみられ、4月に萌芽とそれに続く活発な新梢成長がおり、新梢成長停止は長果枝では6月下旬ごろより観察される。その後、二次伸長する長果枝もあるが樹体全体の枝伸長が停止するのは9月頃であり、この頃から樹体は休眠最深期にはいる。また、休眠の指標のひとつである全落葉は12月上旬であ

る。このように、休眠導入は晩夏から初冬にかけてゆっくりと進行し、それには自発的要因や環境要因、栄養状態や樹勢などが影響し、複雑に制御されていると考えられている。

一方、芽が休眠から覚醒し、開花・萌芽の準備段階にはいるのは12-1月である。園芸学では、芽が自発的に成長を抑制している状態を自発休眠 (endodormancy あるいは rest) とよび、成長に不適な外的要因により成長が抑制されている状態を他発休眠 (ecodormancy) とよぶ。前者は、休眠を“能動的”な現象としてとらえており、後者は“受動的”な意味での休眠である。過去、多くの果樹園芸学研究者がおこなってきた研究により、自発休眠からの覚醒を誘導するもっとも重要な要因は、一定期間の低温遭遇であることがわかっている (Erez et al., 2000)。たとえば、11月のウメ‘南高’の切り枝や鉢植え個体を加温しても通常は開花には至らない。芽では花の原基が備わっていても開花には至らない。しかし、10℃付近の低温に1000時間遭遇させた切り枝では、花芽の肥大が観察され、その後の加温処理により開花にいたる (図-1)。すなわち、芽は一定期間の低温に遭遇していくなかで休眠から成長準備段階へと相が転換され、冬を迎える前の暖かい気候では開花・萌芽せず、冬を経験した後の暖かい気候で開花・萌芽できるよう自発的に生長リズムを整えている。

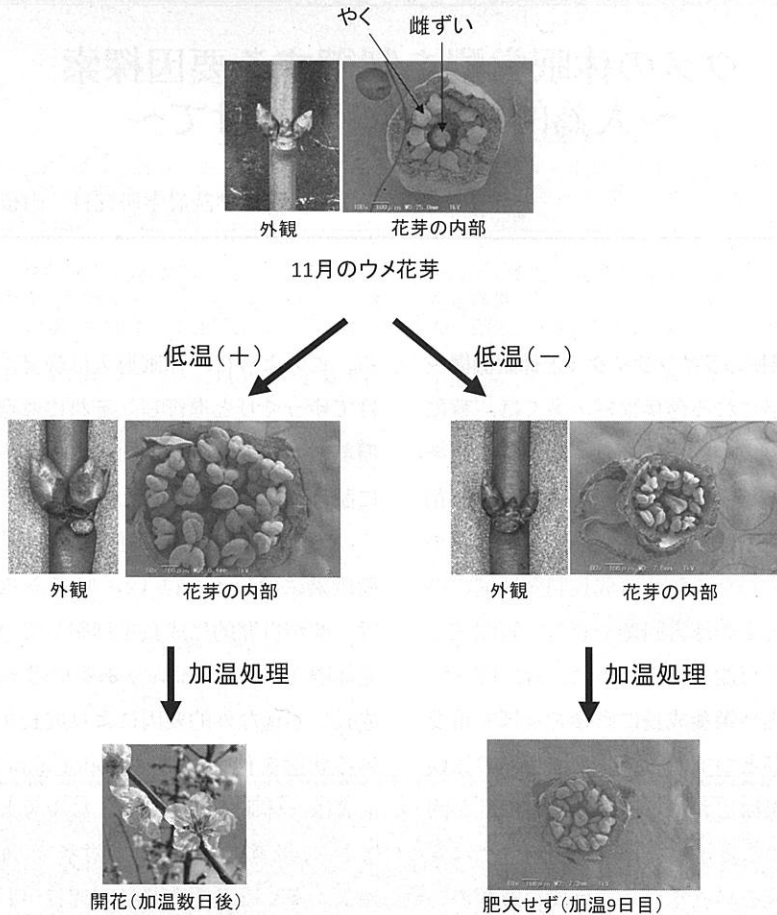


図-1 低温処理によるウメ花芽の肥大。低温(5℃, 1200時間)に遭遇することで花芽の肥大成長が促進され[低温(+ )と低温(-)における内部構造の画像は同じ倍率である], その後の加温で開花がみられた。一方, 低温に遭遇しなければ, その後の加温処理によっても開花はみられず, 枯死した。

#### 既知の休眠打破剤に対するウメの反応

既述のとおり, 多くの果樹は低温要求性を示すが, この性質は施設栽培下での加温促成による花成や結実の前進を妨げる最大の要因でもあり, これまで果樹園芸学研究者は, 低温に替わる休眠打破法の開発をめざし研究を進めてきた(水谷ら, 2002)。高温処理や芽傷処理などの物理的ストレスや, シアナミドやサイトカイニンなどの薬剤散布が休眠打破に有効とされてきた。またモデル植物で盛んに行われている種子休眠の生理学的研究では, ジベレリン

がABAの拮抗作用としてはたらき, 休眠覚醒および発芽促進に効果をもつことがわかっている(Finkelstein et al., 2008)。しかしながら, 果樹の休眠覚醒においては, ジベレリンが処理時期によっては休眠打破を抑制することもあり(水谷ら, 2002), 種子休眠研究で得られた知見をそのまま芽の休眠に適用することはできない。すなわち, 両者とも低温を介した制御機構に支配されているという類似性はあるものの, その生理学的機構は必ずしも一致していない可能性が考えられる。

既知の物理的あるいは化学的な休眠打破処理が、芽の休眠覚醒を促進するのかそれとも萌芽を促進するのかあるいはその両方のはたらきをもつのかは明らかになっていない。休眠覚醒も萌芽促進も、加温後の萌芽割合や速度で評価している以上、どちらに影響を及ぼしているのかを評価することは難しい。ただ、いずれの処理もその個体がついた低温要求量の一部の補完のみにとどまっており、低温遭遇そのものの代替を果たしているとは言いがたいことから、休眠打破効果の主たる要素は萌芽促進効果かもしれない。すなわち、低温遭遇を完全に代替する人為的休眠制御法はないのが現状と言っても過言ではない。実際の現場では、低温要求量の少ない品種・系統の導入により、加温栽培に適応しうる品種を育成するとともに既知の人為的休眠打破（萌芽促進）法によって萌芽や開花の確保に努めるといった方法がとられている。たとえばお正月用のサクラとして流通している山形特産の‘啓翁桜’はもともとの低温要求量が少なく、かつ温湯処理などの人為的操作による萌芽（開花）促進が行われている。

現在、もっとも普及している休眠打破剤のひとつがシアナミドであり、日本カーバイド工業株式会社『CX-10』（シアナミド 10% 液剤）が植物成長調整剤として登録されている（富山，2012）。ブドウやオウトウ、ナシ、モモでは明らかな萌芽促進効果があるとされており、適用が他果樹へと拡大されつつある。また最近、オキシリピンの一種である、9-hydroxy-10-oxo-12(Z), 15(Z)-octadecadienoic acid (KODA) がナシにおいて休眠打破効果をもつことが明らかになった（阪本，2012）。そこで筆者らは、ウメにおいてシアナミドと KODA の効果を検証した。シアナミドの高濃度施与は薬害をもた



図-2 シアナミド (0.5%) 処理によるモモの萌芽促進効果。12月下旬のシアナミド処理によりモモでは休眠が打破された。(写真は処理約1ヶ月後の様子)

らす危険があり、一般にウメやモモなどの核果類では薬害が発生しやすい。0.5%のシアナミドは、モモでは萌芽促進効果を示すものの（図-2）、ウメでは若干の芽枯れがみられた。そこで、0.3%のシアナミドを12月あるいは1月のウメ‘南高’枝に散布処理し、切り枝をチャンバー内で水さしして観察した。その結果、12月処理では、無処理と比較して花芽の開花率に変化はなく、葉芽の萌芽促進効果もみられなかった（Yamane et al., 印刷中）。1月処理では若干の萌芽促進効果がみられたものの、有意差はみられなかった（図-3）。一方、16 $\mu$ MのKODA処理は、全く萌芽促進効果はみられなかった。また、0.3%のシアナミドと16 $\mu$ MのKODAの混合処理では、12月処理では効果がないものの、1月処理では萌芽促進効果を示した（図-3）。

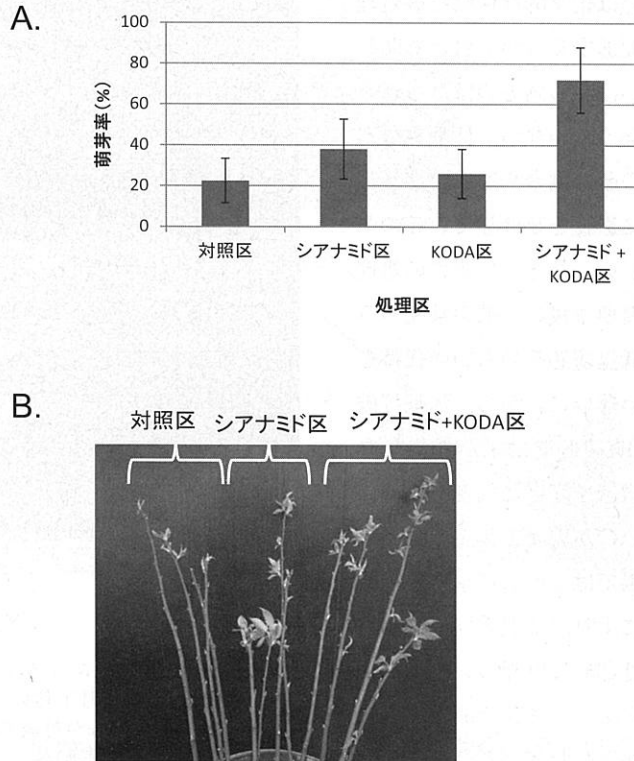


図-3 1月のシアナミド (0.3%), KODA (16 $\mu$ M), あるいは混合処理がウメ葉芽の萌芽に与える影響。(A) 処理3週間後の1枝あたりの萌芽率 (枝5本の平均 $\pm$ 標準偏差)。(B) 処理3週間後の萌芽の様子。シアナミドとKODAの混合処理により枝の先端だけでなく下部からも萌芽した。

以上の結果より、シアナミドについてはウメにおいても潜在的な萌芽促進能力の向上が期待できる結果となった。実際、ウメ立木へのCX-10散布処理による開花前進の報告がなされている(富山, 私信)。しかしながら、これら既知の休眠打破剤がウメの休眠覚醒や低温要求性そのものを劇的に制御できる可能性は低いと考えられた。

#### マイクロアレイ解析による休眠覚醒関与遺伝子の探索

筆者らは、果樹における低温要求性を理解し、休眠の人為的制御につながる知見を得ることを目的に、ウメを材料に、分子生物学的

アプローチにより休眠から休眠覚醒への成長制御に影響をおよぼす遺伝子候補の探索を進めてきた。芽の休眠覚醒は、遺伝的影響ばかりでなく環境要因や樹勢の影響も受け、多くの遺伝子が複雑に関与する形質である(Cooke et al., 2012)。筆者らは、トランスクリプトーム解析手法のひとつであるマイクロアレイ解析によって休眠覚醒に関与する候補遺伝子の探索を試みた。トランスクリプトーム解析は、対象となる形質の変化とともに遺伝子転写産物量が変動する遺伝子を探索することで、対象形質に関与する候補遺伝子を探索する手法である。まず、ウメの芽から様々な発達ステージで発現している遺伝子断片(EST)を収集した(Habu et al.,

2012)。得られた遺伝子配列を元に、約 60000 の異なる EST に相当するプローブを搭載したアレイを構築した。そして、休眠中あるいは低温遭遇により休眠から覚醒した芽サンプルを用いてハイブリダイゼーションをおこない、発現が変動する遺伝子を探索した。その結果、休眠芽で高発現し、低温遭遇に伴って休眠から覚醒するにつれて発現が低下する遺伝子を同定した。この遺伝子は、植物に広く存在し形態形成に関与する MADS-box 転写因子のひとつであり、ウメには少なくとも 6 つの相同遺伝子がゲノム上にタンデムで存在しており、*Prunus mume* DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box1-6 (*PmDAM1-6*) と命名した (Yamane et al., 2008)。なかでも *PmDAM6* 遺伝子は、非休眠覚醒誘導条件下では発現が低下せず、休眠が維持されている期間の芽で発現が維持されていた。また、低温要求量の少ないウメ品種では短期間の低温遭遇で発現が低下していた (図-4)。以上の結果は、*PmDAM6* 遺伝子が休眠を正に制御する遺伝子として機能している可能性を示唆している。そこで、*PmDAM6* 遺伝子の生化学的機能を探るため、形質転換が容易なモ

デル樹木であるポプラに *PmDAM6* 遺伝子を導入した形質転換体を出し、野生型との成長比較をおこなった。

#### DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box (*DAM*) 遺伝子の生理学的機能

野生型のポプラがシュート成長を持続する長日条件下において、*PmDAM6* 過剰発現ポプラは頂芽を形成した。また、短日条件におくことで休眠導入を誘導し、一定期間の低温遭遇後に促成条件下におき、頂芽の萌芽率を観察した。その結果、*PmDAM6* 過剰発現ポプラの休眠覚醒が遅延傾向にあることが示された。以上の結果は、*PmDAM6* 遺伝子がポプラ茎頂部の成長を抑制する働きをもつことを示唆している。一方、側芽の休眠に対する影響を調査すると、*PmDAM6* 過剰発現ポプラは概してシュートの求頂的成長が抑制されていたが、ひこばえの発生頻度やシュート基部における萌芽の程度は野生型と同程度あるいはそれ以上に旺盛なものもみられた。すなわち、*PmDAM6* はポプラにおいて、樹体全体の休眠を導入および維持することはできないが、求頂的な成長を抑制する機能

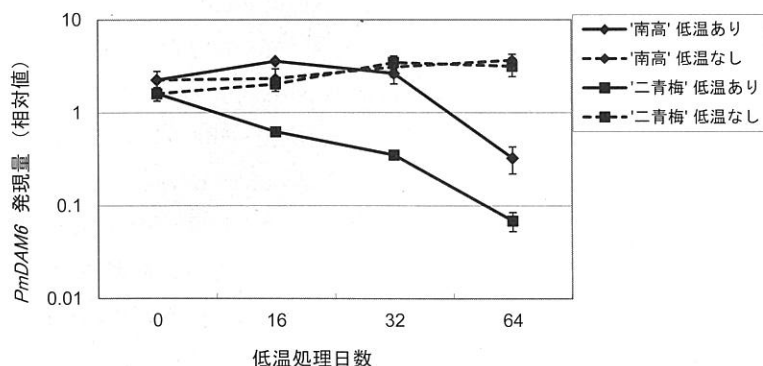


図-4 ウメ 2 品種の *PmDAM6* 遺伝子発現の変化。'南高' は低温 64 日目で、'二青梅' は低温 32 日目で明確な休眠覚醒が観察された。両品種とも低温にさらされない対照実験では休眠から覚醒しなかった。'南高' では低温 64 日目に、'二青梅' では低温 16-32 日目に、*PmDAM6* 遺伝子発現量の低下がみられた。一方、非低温処理区では発現低下がみられなかった。



をもつことが示された。以上の結果から、ウメの休眠期に多く発現している *PmDAM6* 遺伝子は、求頂的成長抑制作用を発揮し、休眠の導入および維持の一端を担っている可能性が示唆された。現在筆者らは、独立行政法人果樹研究所 リンゴ研究拠点との共同研究により、リンゴ形質転換体を用いた *PmDAM6* 遺伝子の機能解析を続けるとともに、転写因子である *PmDAM6* が制御する下流標的遺伝子の探索を進めている。

### おわりに

果樹の芽の休眠は、環境要因や栄養状態の影響を受ける複雑な形質である。すなわち、休眠は多くの遺伝子ネットワークが複雑に絡み合っ て制御されている。また、樹体の休眠深度を即座に視覚的に判断することは困難である。これらの休眠特性は木本作物における休眠機構解明の障壁であり、ひいては新規休眠打破剤開発を難しくする要因のひとつである。筆者らは、分子生物学的手法を用いて、ウメの休眠制御機構の一端を担う転写因子 *PmDAM6* を同定した。*PmDAM6* 遺伝子の発現変動は、ほかのどの遺伝子よりも密接に休眠深度と相関がある。よって、*PmDAM6* 遺伝子を休眠のバイオマーカーとして利用できるのではないかと考えている。*PmDAM6* 遺伝子の発現を制御する化合物を網羅的に探索できれば、新規休眠打破剤の開発が期待できる。果樹生産を活性化するイノベーション創出をめざして今後も研究を進めていきたい。

### 謝辞

本研究は、生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」および日本学術振興会

「科学研究費補助金」による助成を受け、多くの大学院生やポスドク、共同研究者の方々とともにおこなったものです。また、このような執筆の機会をいただいたことに、深く感謝いたします。

### 参考文献

- Cooke, J. E., M. E. Eriksson and O. Junttila. 2012. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant Cell Env.* 35: 1707-1728.
- Erez, A. 2000. Bud dormancy; phenomenon, problems and solutions in the tropics and subtropics. P. 17-48. In A. Erez (ed.), *Temperate fruit crops in warm climates*. Kluwer Acad. Publishers, London.
- Finkelstein, R., W. Reeves, T. Ariizumi and C. Steber. 2008. Molecular Aspects of dormancy. *Ann. Rev. Plant Bio.* 59: 387-415
- Habu, T., H. Yamane, K. Igarashi, K. Hamada, K. Yano and R. Tao. 2012. 454-pyrosequencing of the transcriptome in leaf and flower buds of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) at different dormant stages. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 81: 239-250.
- 水谷房雄ら, 2002. 最新果樹園芸学. 朝倉書店
- 阪本大輔, 2012. ニホンナシにおける 9-hydroxy-10-oxo-12(Z), 15(Z)-octadecadienoic acid (KODA) が与える影響～花芽形成促進および休眠打破効果について～. *植調* 46: 3-12.
- 富山政之, 2012. シアナミド剤『CX-10』について. *植調* 46: 31-37
- Yamane, H., M. Yokoyama and R. Tao. KODA enhanced dormancy breaking effects of cyanamide on peach (*Prunus persica*) leaf buds.

Acta Hort. (*in press*)  
Yamane, H., Y. Kashiwa, T. Ooka, R. Tao and K.  
Yonemori. 2008. Suppression subtractive  
hybridization and differential screening reveals

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

天下無草

新登場

非選択性茎葉処理除草剤

**ザクサ**<sup>®</sup>

液剤

ザクサ普及会  
北興化学工業株式会社  
[事務局] Meiji Seika ファルマ株式会社  
〒104-8002 東京都中央区京橋2-4-16

ザクサ®はMeiji Seika ファルマ(株)の登録商標