

博士論文

ボルドー液によるナシの単為結果誘起と栽培への利用

Induction of pear parthenocarpy by
Bordeaux mixture and its use for practical cultivation

平成 27 年 7 月

三重大学大学院生物資源学研究科

林田大志

【目次】

	ページ
緒言	1
第一章 ナシ花柱の RNase 活性阻害を示す重金属塩の探索とそれらの着果誘起力	4
第一節 重金属塩による花柱 RNase 活性抑制とその機構	4
第二節 重金属塩による‘幸水’の着果促進	15
第二章 重金属塩による着果誘起機構	20
第一節 重金属塩と花粉管伸長との関係	20
第二節 重金属塩とエチレンとの関係	28
第三節 雌蕊・花台による重金属イオンの吸収	39
第三章 重金属イオンによる着果誘起の品種間差	46
第一節 品種間差の確認	46
第二節 着果と内生重金属イオンとの関係	57

第四章　ボルドー液による‘幸水’の着果誘起および 果実肥大	63
第一節　ボルドー液による着果誘起	63
第二節　ボルドー誘起果の成長改善	70
第五章　ボルドー液による‘幸水’の省力着果管理栽培	81
第一節　露地栽培	81
第二節　加温・無加温ハウス栽培	94
第六章　総合考察	107
摘要	113
Summary	116
謝辞	119
引用文献	120

緒 言

植物が多様性に富んだ特質を子孫集団に持たせるための戦略に、自家不和合性がある (de Nettancourt, 1977). 自家不和合性とは、雌雄の生殖器官は正常であるが、受粉から受精に至る過程で自・他の花粉を認識し、自己の花粉発芽や花粉管伸長を阻害して自家受精を妨げる性質のことである。自家不和合性は、孢子体型 (アブラナ科, ヒルガオ科, キク科など) と配偶体型 (バラ科, ナス科, ゴマノハグサ科など) に分類される。前者は、花粉表面に存在する親植物の不和合性遺伝子型 (S 遺伝子型) と花柱の遺伝子型に、後者は花粉の S 遺伝子型と花柱の 2 つの S 遺伝子のどちらかに一致した場合、不和合となる (de Nettancourt, 1977).

配偶体型自家不和合性において、1980 年代後半にナス科の *Nicotiana alata* の雌蕊中で特異的に発現し、S 遺伝子座にリンクしている分子量約 3 万の糖タンパク質が検出され、その cDNA がクローニングされた (Anderson et al., 1986). その後、*N. alata* の S₂ 糖タンパク質が、コウジ菌が分泌する加水分解酵素の 1 つである *RNaseT₂* の塩基配列と相同性があることが分かり (Kawata et al., 1988), 実際に S タンパク質が RNase 活性を持つことが示されて以来 (McClure et al., 1989), この S タンパク質を *S-RNase* と呼ぶようになった。現在までに、ニホンナシが属するバラ科の自家花粉管伸長は花柱内で阻害され、それには *S-RNase* の RNase 活性が関与することが解っている (Huang et al., 1994; Kowyama et al., 1994).

果実生産において、自家不和合性は大きな障害となっている。この問題に対処する 1 つの方法として、和合品種の混植が行われている。しかし近年、農作物への農薬散布を規制して安全な食料生産を目指すポジティブリスト制導入もあり、栽培管理法の異なる二品種の混植はこうした流れに逆行する。さらに、ナシは虫媒花であり、花粉を媒介する昆虫は農薬の多用によって激減しており、また、昆虫の活動は低温などの開花期の気候要因により影響されるので、十分な着果を期待できない。従って、主要なナシ産地では人工受粉が生産量確保の必須作業となっている。しかし、近年の農業従業者の高齢化、後継者不足、さらに雇用労力の獲得が困難な状況では、受粉作業は経営規模拡大の重要な制限要因となっている。このような問題を解決するため、‘おさ二十世紀’などの自家和合品種の育成が進められているが、完全和合性品種では摘果に膨大な時間を要するため、これにも問題が残る。従って、効率的に着果・摘果させるための 1 つの方法として、自家摘果性品種（適度に着果する品種）の育成や適切な摘果剤の開発が求められている。

近年、 ZnSO や CuSO_4 などの重金属塩が *Lycopersicon peruvianum* の S-RNase 活性を抑制することが報告された (Kim et al., 2001)。また、これら重金属塩を含み、野生種トマトやリンゴなどの自家不和合性打破が可能とされる “apple+” が開発されたが (Chung et al., 2005)、この薬剤はニホンナシに着果促進効果を示すが、果実の発育は極めて悪かった (平塚ら, 2009)。

以上の背景を鑑み本研究では，まずニホンナシ‘幸水’の花柱 RNase 活性を抑制する重金属塩を探索し，それらが着果誘起するか否かを検討した．次に，重金属塩による着果誘起のメカニズムを解明するとともに，重金属塩による着果促進効果の品種間差およびその原因を調査した．最後に，‘幸水’栽培園で利用できる無受粉・無摘果栽培法の確立に向けた処理法を検討した．

第一章 ナシ花柱の RNase 活性阻害を示す 重金属塩の探索とそれらの着果誘起力

第一節 重金属塩による花柱 RNase 活性抑制とその機構

ZnSO₄ と CuSO₄ が *Lycopersicon peruvianum* の S-RNase 活性を抑制するとされている (Kim et al., 2001). これら金属塩の S-RNase 活性阻害効果を利用して, 韓国の ISTECH 社が自家不和合性打破剤として “apple+”を開発した (Chung et al., 2005). この薬剤は, 特許申請書において *in vivo*での S-RNase 活性抑制, および圃場での野生種トマト, リンゴ‘ふじ’などの自家不和合性打破が可能とされている. この薬剤の‘幸水’に対する効果を調査した結果, 花柱 RNase 活性を抑制して, 着果促進効果が見られた. しかしながら, 果実の発育は劣っており, 実用化には向かないと判断された (平塚ら, 2009). そこで本節では, ‘幸水’花柱 RNase 活性を抑制する金属塩を探索するとともに, 金属塩による花柱 RNase 活性抑制のメカニズムを明らかにしようとした.

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植のニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) ‘幸水’を 1 本供試した.

実験方法

－花柱タンパク質の抽出－

バルーンステージの花を採取し，花柱を分離後，使用するまで液体窒素中で保存した．花柱タンパク質の抽出は，中嶋（2006）の方法を改良して行った．氷上で，花柱重量の 30% のポリクラール AT と抽出バッファー[150mM NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 10mM L-cysteine, 1mM L-ascorbic acid 0.01M KClを含む 50mM Tris-HCl バッファー (pH8.4)] 中で花柱をホモジナイズし，これを 16,000g, 4℃で 10 分間遠心分離し，上清を Sephadex G-25 カラムに通してポリフェノールを除去した．得られたタンパク質に 100%飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加し，30 分間静置した．その後，16,000g, 4℃で 10 分間遠心分離してタンパク質を沈殿させた．得られたタンパク質沈殿物を少量の 50mM Tris-HCl バッファー (pH8.4) で溶解後，実験に用いるまで -30℃で保存した．タンパク濃度は，Bradford 法 (1976) により決定した．

－RNase 活性の測定－

CaCl_2 , ZnSO_4 , MgSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 および $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 添加後の花柱 RNase 活性抑制程度を調査した．RNase 活性測定は，Brown and Ho (1986) の方法に従って行った．50 μg の花柱タンパク質，500 μL の 4mg/mL torula yeast RNA (Sigma, USA)，および金属塩が反応液中に 1mM になるように添加し，総量を 50mM Tris-HCl バッファー (pH8.4) で 750 μL に調製した．これを 55℃，30 分間インキュベートし，反応を停止させるために 20%トリクロロ酢酸を 250 μL 加えた．これを 20,000g で 10 分間遠心分離し，上清を 100 倍

希釈して分光光度計（UV-1800 島津製作所，京都）を用いて OD260 を測定した．対照区には，花柱タンパク質の代りにバッファーを同量加え，以下すべて同じ条件とした．上述した金属塩の濃度は Kim et al (2001) を参考に決定した．なお，活性抑制が見られた CuSO_4 による抑制の濃度依存性についても調査した．

ー 各種 RNase 活性に及ぼす CuSO_4 の影響 ー

CuSO_4 を最終濃度で 1mM となるよう添加し，RNase A（和光純薬，大阪），RNase T₁（Sigma, USA），RNase B（Sigma, USA）および RNase S（Sigma, USA）への活性抑制効果を調べた．なお，測定方法は上記と同じとし，各酵素は約 20U を用いて対照区との差を決定した．

ー CuSO_4 -タンパク質混合物の Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィーによる分離 ー

タンパク質と Cu^{2+} が，溶液中でどのように存在しているかを調査した．5mM CuSO_4 と 2.5mg 花柱タンパクを含む 50mM Tris-HCl（pH8.4）を 1mL 作成し，これを Sephadex G-10 カラム（横 17 mm×縦 250 mm）で分離し，2mL ずつ分取した．各分画中のタンパク質を Bradford（1976）法で，また， Cu^{2+} を原子吸光分光光度計（AA-6200 島津製作所，京都）で検出した．

ー CuSO_4 -タンパク質混合物から硫酸アンモニウムによって分離したタンパク質の RNase 活性 ー

50mM Tris-HCl (pH8.4) に溶解した 50 μ g の花柱タンパク質に 2 mM となるよう CuSO_4 を添加し, 5 分間静止後に 70% の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ によってタンパク質を塩析した. このタンパク質を 15,000 \times g で 10 分間遠心分離して採集し, 50mM Tris-HCl (pH8.4) で再溶解した. このタンパク質の活性を, CuSO_4 を添加しないで同様の操作を行ったタンパク質の活性と比較した.

結果

CaCl_2 , MgSO_4 および $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ は花柱 RNase 活性を抑制せず, むしろ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ と CaCl_2 は促進した (図 1). 一方, CuSO_4 と ZnSO_4 は有意に活性を抑制し, FeSO_4 でも若干の抑制が見られた. 1mM の CuSO_4 と ZnSO_4 による抑制程度は対照区の 1/3 以下であり, 抑制は濃度依存的であった (図 2). 次に, Cu^{2+} がどのように RNase を抑制しているかを知る目的で, Cu^{2+} とタンパク質とが結合しているかを CuSO_4 -タンパク質混合物を SephadexG-10 カラムで分離して調査した (図 3). タンパク質の溶出ピークは No.11 分画であり, Cu^{2+} は No.14 であったことから, Cu^{2+} は花柱タンパク質と結合していないことが示唆された. また, CuSO_4 溶液中のタンパク質を硫酸アンモニウムで塩析した時の RNase 活性は殆ど回復しており, 対照区の約 90% の活性を示した (図 4). 一方, CuSO_4 は RNase A を極めて強く抑制し, RNase S を 50% 以上抑制したが, RNase B に対する抑制効果はなかった (図 5). また, RNase T₁ に対する抑制は弱かった.

考 察

花柱タンパクの RNase 活性は、1mM の CuSO_4 や ZnSO_4 添加によって対照区の 1/3 以下に抑制され、その抑制程度は濃度依存的であった。これら重金属塩と RNase 抑制に関する知見はほとんどなく、そのメカニズムは不明である。ピリミジン残基を認識して切断する RNase A 活性は金（Ⅲ）イオンによって抑制され、酵素と金イオンは非常に強く結合する (Maruyama et al., 2007)。従って、活性阻害は CuSO_4 よりむしろ Cu^{2+} によって引き起こされるものと推察される。しかしながら、本実験では分子ふるいカラムによって CuSO_4 -タンパク質混合物から Cu^{2+} が容易に分離され、さらに、 CuSO_4 から硫酸アンモニウムによって分離したタンパク質の RNase 活性はほとんど回復した。これらの結果は、 Cu^{2+} が花柱 RNase と強く結合せず、溶液中で相互作用していることを示唆する。

一方、 CuSO_4 は RNase A を強く抑制したが、RNase B は抑制しなかった。このように、抑制効果は RNase によって様々であった。RNaseT₁ の活性に重要な部位として、グアニン塩基認識部位と触媒部位がある（西川ら，1987）。Tyr42 から Glu46 の領域での水素結合とスタッキング効果が、グアニン塩基認識に重要であるとされており（西川ら，1987）， CuSO_4 が花柱 RNase の水素結合あるいはスタッキング構造に影響を及ぼしているのかもしれない。一方、RNaseT₁ と RNaseA との間に構造上（一次構造から三次構造まで）の共通性はないが、反応機構に類似性がある（西川ら，1987）。従って、触媒部位の構造の違いが重金属による活性抑制程度

の違いの原因となっている可能性がある。また、RNase B は RNase A の側鎖に糖が付加した酵素であり、糖はタンパクのフォールディングや細胞間のシグナル伝達を補助する (Magnelli et al., 2011)。RNase A と B の間の CuSO_4 による抑制の違いは、酵素タンパク質のフォールディングの違いによるものかもしれない。また、 Cu^{2+} はアルツハイマー病の発症に関わる β アミロイドタンパク質凝集体を破壊するが、これは Cu^{2+} がタンパク質構造の転移を促進したためであると推測されている (Zou et al., 2001)。このように、重金属塩処理が RNase の立体構造に影響を及ぼし、その結果として活性阻害が生じている可能性は十分考えられる。

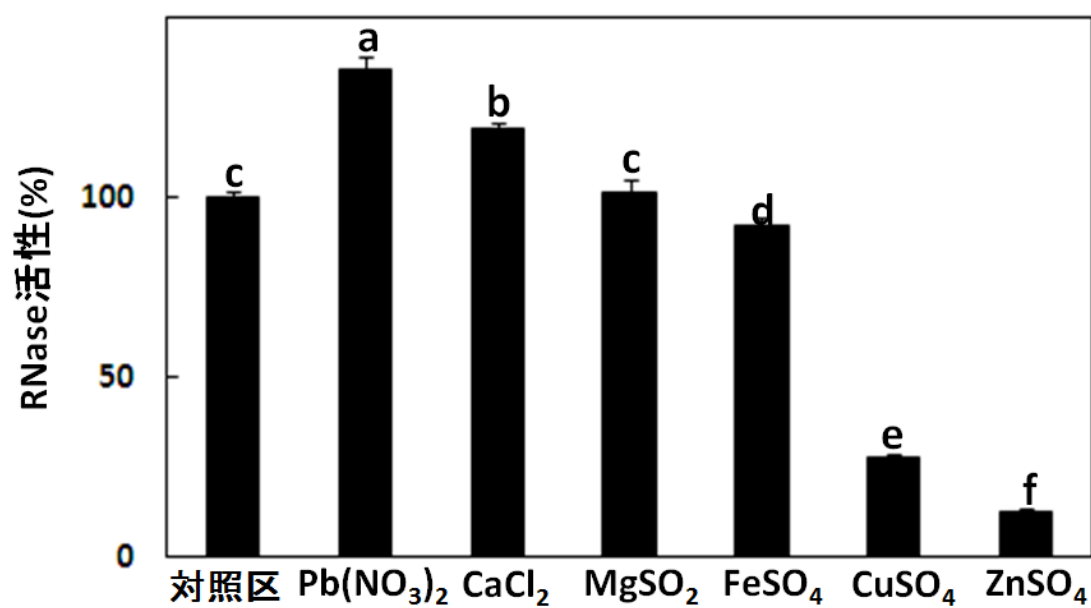


図 1. 数種の重金属塩がナシの花柱 RNase 活性に及ぼす影響.

各処理区は 50 μ g タンパク質および 1mM 金属塩を含む

対照区はバッファーのみ

各値は対照区を 100%としたときの割合

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Duncan の多重検定によって 5%水準で有意差があることを示す

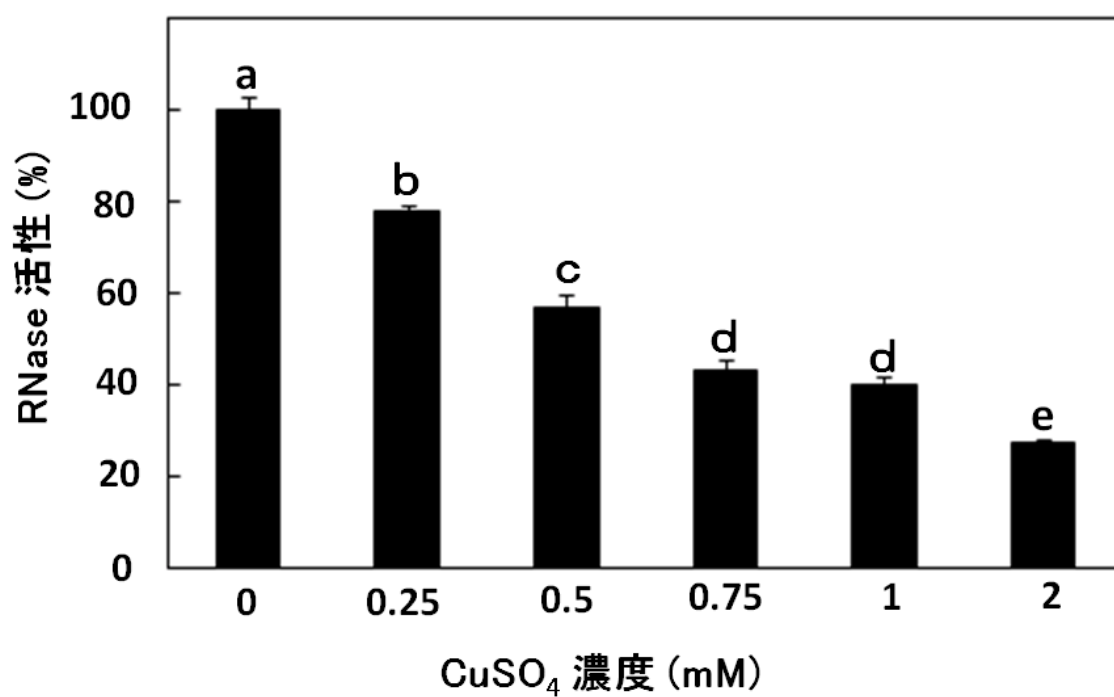


図 2. 花柱 RNase 活性に及ぼす CuSO₄ 濃度の影響.

各処理区は 50 μ g タンパク質および記載した CuSO₄を含む
各値は 0mM の値を 100%としたときの割合

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Duncan の多重検定によって
5%水準で有意差があることを示す

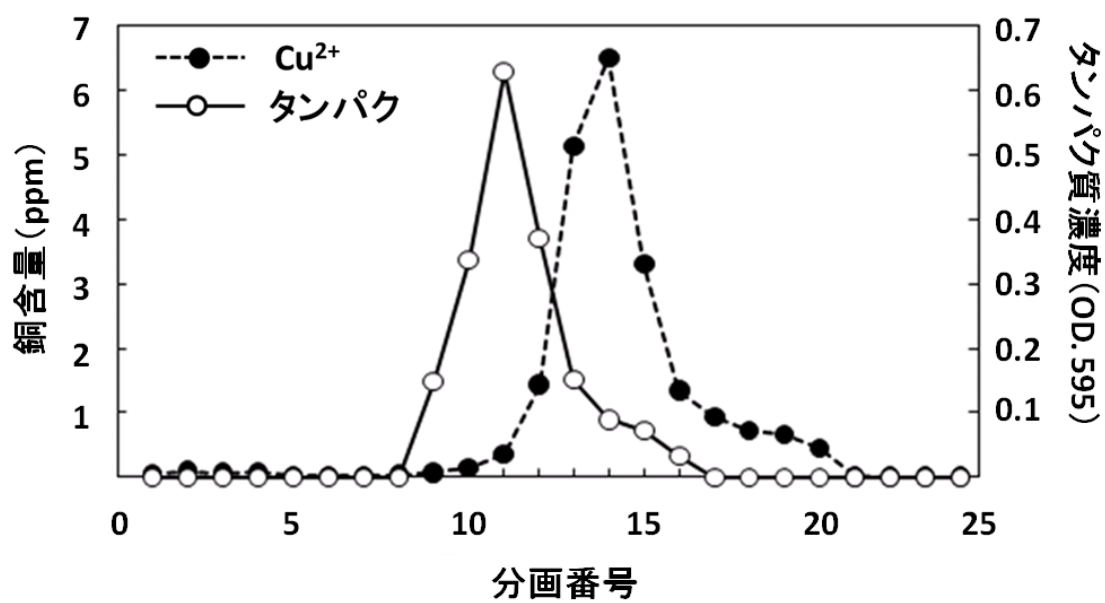


図 3. Sephadex G-10 ゲルクロマトグラフィーによる
タンパク質と銅イオンの溶出パターン。

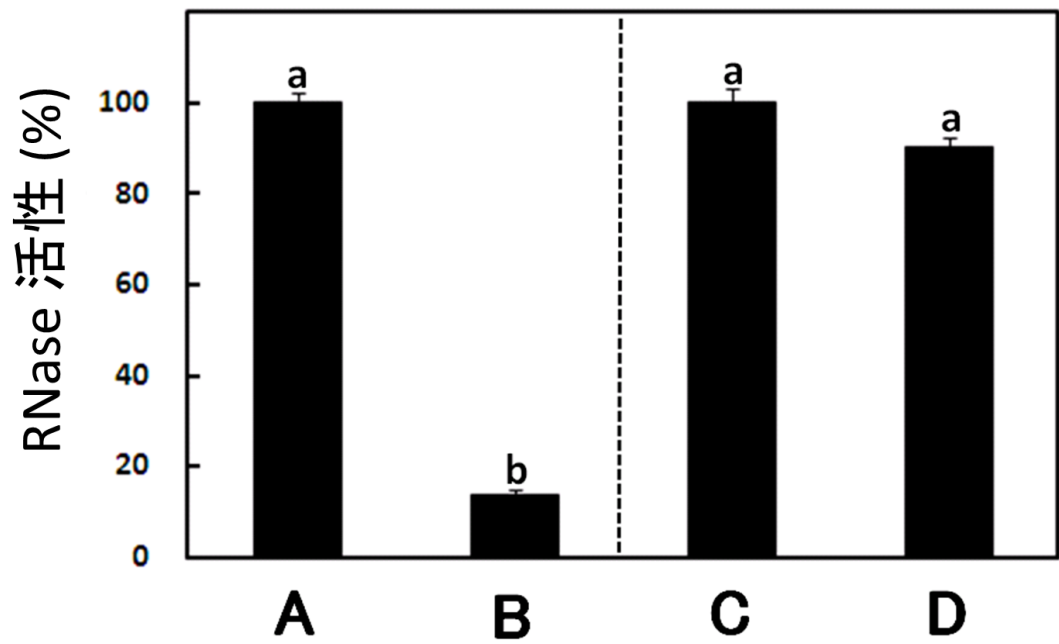


図 4. $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 塩析によって CuSO_4 から分離した

タンパク質の RNase 活性.

各値は対照区を 100%としたときの割合

A : 花柱 RNase (対照区)

B : 花柱 RNase + 2mM CuSO_4

C : $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 塩析によって A から単離した花柱 RNase

D : $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 塩析によって B から単離した花柱 RNase

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Duncan の多重検定によって

5%水準で有意差があることを示す

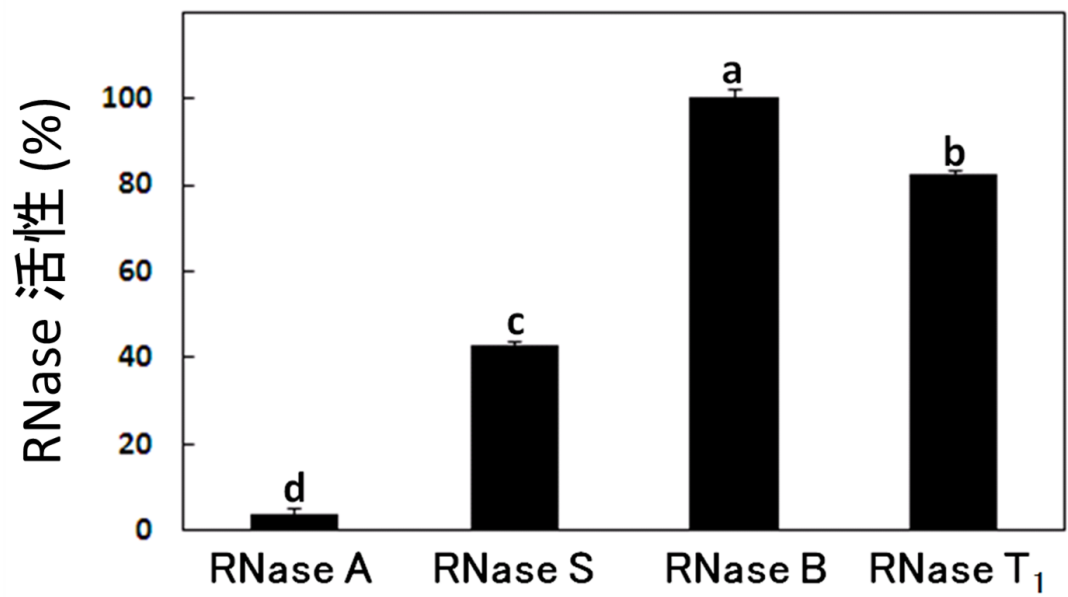


図 5. 数種の RNase 活性に及ぼす CuSO_4 の影響.

CuSO_4 濃度 = 1mM

各値は対照区の値を 100%としたときの割合

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Duncan の多重検定によって
5%水準で有意差があることを示す

第二節 重金属塩による‘幸水’の着果促進

ニホンナシの不和合花粉管伸長を抑制するためには *S-RNase* の RNase 活性が必要であり (Hiratsuka et al., 2001), ジャガイモでは *S-RNase* 活性が 1/3 以下になれば和合になるという報告がある (Qin et al., 2006). 前節における実験で, ZnSO_4 と CuSO_4 が‘幸水’の花柱 RNase 活性を対照区の 1/3 以下にまで抑制することが明らかとなったため, これら重金属処理による‘幸水’の不和合性打破ができるかもしれない.

そこで本節では, 開花前の花に CuSO_4 を処理し, 着果誘起できるか否かを調査した. また, 着果誘起が CuSO_4 の Cu^{2+} に起因するのか SO_4^{2-} によるものかを確認するための実験を行った. 一方, 開花前の黒斑病・黒星病防除のために CuSO_4 を含むボルドー殺菌剤があり, これが着果を誘起すれば CuSO_4 処理と開花前の病害防除の両方が不要となり, 大幅な省力化が可能となる. 従って, ニホンナシの開花前黒斑病・黒星病防除剤として登録のある IC ボルドー 48Q に着果誘起効果があるかも調査した.

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植の‘幸水’を 1 本供試した.

実験方法

処理区と対照区に数本の側枝をランダムに選び、全て開花 10 日前の蕾に揃えた。これに 0.1% Tween-20 を含む 2mM CuSO_4 、対照区に 0.1% Tween-20 を処理し、また、着果誘起効果を示すイオンの特定のため、同じ硫化物イオンを含む 2mM Na_2SO_4 および K_2SO_4 を同様に処理した。さらに、 CuSO_4 を含むボルドー液が同様に着果を誘起するか調査するため、30 倍希釈した IC ボルドー 48Q（井上石灰工業，高知）を同様に処理した。重金属塩の処理濃度は、前節の結果を踏まえて決定した。開花当日に自家受粉し、他家受粉を避けるため花そうを紙袋で覆い、着果率を開花 2, 3 および 4 週間後に調査した。これらの実験には、それぞれ 70 花を供試した。

結果

CuSO_4 処理区の着果率の経日的変化をみると、2 週間後までに急激に落果が生じ、その後安定した着果率となった（図 6）。開花 4 週間後の CuSO_4 区は 32% だったのに対し、対照区では 6% であり、処理の効果が確認された（図 7）。また、ボルドー液も 14% と着果誘起効果を示した。一方、受粉 4 週間後の Na_2SO_4 と K_2SO_4 の着果率はそれぞれ 6 および 4% であり、これらの塩は着果誘起しないことがわかった。このように、 CuSO_4 やボルドー液には明らかに‘幸水’の着果促進効果があることが認められ、その効果は Cu^{2+} イオンによるものであることが確認された。

考察

CuSO_4 は着果を誘起したが、 Na_2SO_4 と K_2SO_4 にはその効果が認められなかったことより、着果誘起は Cu^{2+} に起因することが判明した。ニホンナシの不和合花粉を拒絶するためには *S-RNase* の RNase 活性が必要であり (Hiratsuka et al., 2001), ジャガイモでは *S-RNase* 活性が 1/3 以下になれば和合になるという報告がある (Qin et al., 2006)。前節の結果から CuSO_4 は花柱 RNase を著しく抑制することより、 CuSO_4 処理は‘幸水’の花柱 RNase 活性を抑制し、自家受精させて着果したと思われた。しかし、RNase 活性抑制力の弱い FeSO_4 も同様の着果率を示したことより (林田ら, 2009), RNase 活性抑制と着果とは無関係の可能性もある。従って、次章において、重金属イオンが不和合性を打破するかについて詳しくすることとした。なお、5mM の重金属塩処理で薬害、0.5mM では効果が低いことから、圃場で散布する際は 2mM が最適濃度と判断された。また、第 4 章で処理時期を変えることにより、着果誘起効果が増減できることを明らかにしている。一方、ボルドー液は CuSO_4 と同様に着果を誘起し、ボルドー液には着果誘起効果があると考えられた。そこで次章から、圃場実験では CuSO_4 の代わりにボルドー液を用いることとした。また、ボルドー液の着果誘起効果については、第 4 章で詳しく考察する。

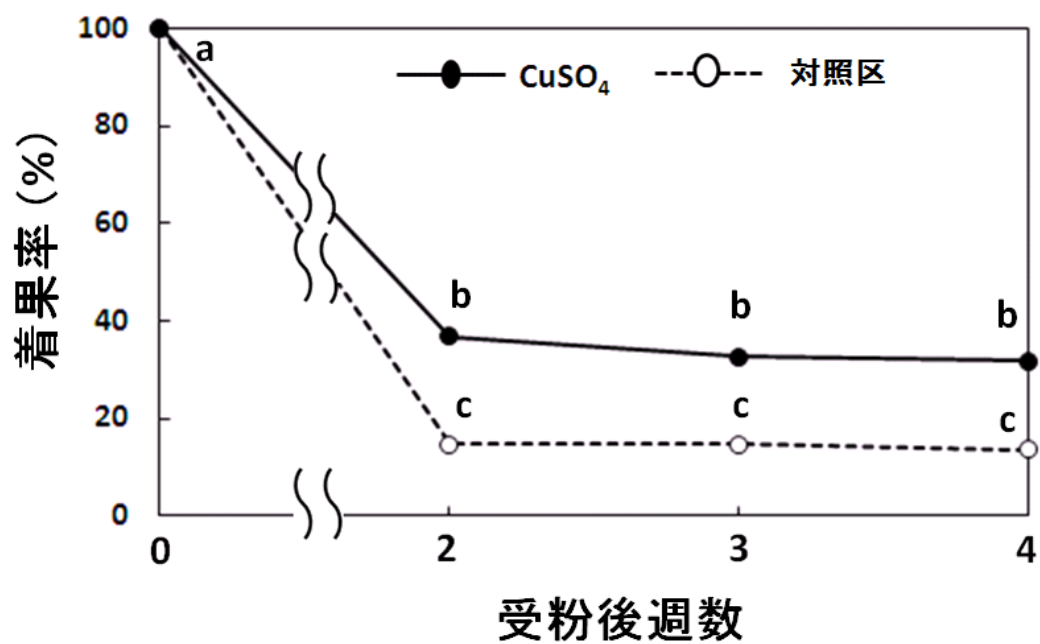


図 6. CuSO₄ 処理が自家受粉 ‘幸水’ の着果に及ぼす影響.

CuSO₄ 濃度 = 2mM

対照区は 0.1% Tween-20 処理

R2.15.1 software (R Development Core Team, 2010) を用いた解析により, CuSO₄ 処理の曲線は 5%水準で対照区と有意差がある

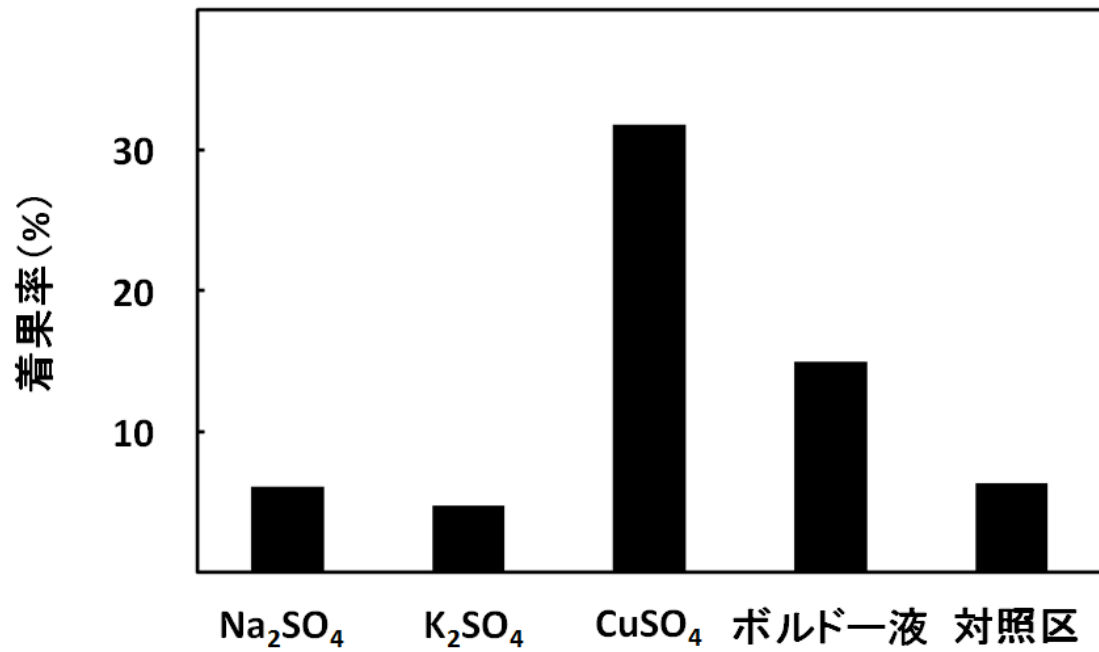


図 7. 数種の硫酸塩およびボルドー液処理が自家受粉‘幸水’の着果に及ぼす影響.

開花 4 週間後の着果率

各塩濃度 = 2mM

対照区は 0.1% Tween-20 処理

第二章 重金属塩による着果誘起機構

第一節 重金属塩と花粉管伸長との関係

前章において、 Cu^{2+} と Zn^{2+} は花柱 RNase 活性を強く抑制し、‘幸水’の蕾への処理は着果を誘起した。一方、 Fe^{2+} は RNase 活性を抑制しないにもかかわらず、同様に着果を誘起した。さらに、重金属イオンによって誘起された果実は、小さいものが頻繁に見られたことより、受精が完全に行われていないことが示唆された。

従って本節では、重金属イオン処理後の花柱内の自家花粉管伸長と果実内の種子数を調査し、実際に不和合性が打破されているかを検討した。

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植に栽植されている‘幸水’および他家受粉用の‘長十郎’の成木 1 本を使用した。

実験方法

－花粉管伸長観察と種子形成－

開花 8 日前の蕾を除雄後、30 倍希釈した IC ボルドー 48Q（井上石灰工業，高知）および 2mM FeSO_4 溶液を散布し，他家受粉を防ぐため袋掛けした。その後，開花当日に自家受粉または他家受粉（‘長十郎’）を行った。受粉 72 時間後に採

取し，FAA（ホルムアルデヒド：酢酸：70 % エタノール（1：1：18）で固定後，花柱基部のパラフィン切片を作成した．キシレン-エタノールシリーズを介してパラフィンを融解後，切片を 30mM K_3PO_4 に溶解した 0.1% アニリンブルー溶液中で 2 時間染色し，蛍光顕微鏡（BH-2 RFL-T オリンパス，東京）下で観察した．なお，各処理区で 25 本以上の花柱を観察した．

また，重金属塩によって誘起された果実を収穫期に採取し，果実内の種子を調査した．その際，対照区として 0.1% Tween-20 によって誘起された果実内の種子を用いた．

－花粉発芽に及ぼす $CuSO_4$ と $FeSO_4$ の影響－

開花直前の‘幸水’の花から葯を採取し，シリカゲル中で開葯・乾燥させて葯壁と花粉に分離後，実験に用いるまで $30^{\circ}C$ で保存した．10% スクロース，1% 寒天粉末および 0.01% ホウ酸を含む寒天培地を作成し， $CuSO_4$ と $FeSO_4$ を最終濃度が 0, 0.5, 2 および 5mM となるように添加した．培地上に花粉を撒いて暗黒下で $25^{\circ}C$ ，24 時間培養し，コットンブルー溶液で染色後，光学顕微鏡下（BH-2 オリンパス，東京）で観察した．1 処理につき少なくとも 50 以上の花粉粒を観察し，各処理区で 3 反復した．

結果

両処理区の花柱基部で自家花粉管は見られず（図 8），花柱上部で伸長は止まっていた（データ省略）．他家受粉区では，基部まで到達する多くの花粉管が確認された．また，両処理で誘起された果実内の種子のほとんどは不完全種子であった

が（図 9A），普通に見られる不完全種子より黒く大きかった（図 9B）．一方，重金属塩添加後の花粉発芽率は， CuSO_4 , FeSO_4 とともに濃度依存的に減少した（図 10,11）．

考察

重金属イオンによって自家不和合性が打破されているのかを知るため，処理後の花柱内の自家花粉管伸長を観察した．重金属イオン処理後の花柱基部では，花粉管は確認できなかった．受粉 72 時間後の和合花粉管は明らかに花柱基部を通過している時期であることより（Hiratsuka and Tezuka, 1980），処理によって自家花粉管伸長が促進されないことが明らかとなった．また，重金属イオン処理で誘起された果実内には，完全種子は確認できなかった．さらに， CuSO_4 や FeSO_4 は，*in vitro* での花粉発芽を著しく抑制した．これらの結果から，重金属イオンは花柱 RNase 活性を抑制するにもかかわらず，自家不和合性を打破しないため，着果は単為結果によるものであることが確認された． FeSO_4 は，花柱 RNase 活性を殆ど抑制しないにもかかわらず同様の着果を誘起したことは，この結論を支持する． Cu^{2+} は花柱 RNase 活性を抑制するのに自家不和合性を打破できない理由として，以下の可能性が考えられる．① Cu^{2+} は RNase を抑制するだけでなく，花粉管伸長も抑制するので，花柱内の花粉管伸長が抑制される，② ‘幸水’花柱は， S_4 -および S_5 -RNase とともに強い活性を示す *non-S-RNase* を有しており（Norioka et al., 2007）， Cu^{2+} は *non-S-RNase* 活性のみを抑制する③ ボルドー液処理後のナシ花柱は，*S-RNase* を不活化するのに十分な量の Cu^{2+} を吸収し

ていない.

重金属イオンとナシの単為結果との関係を論じた報告はないが, ナシの着果には植物ホルモンが関与する. 例えば, エチレンはリンゴ (Dal et al., 2005; Fukui et al., 1984), カンキツ (Gomez et al., 2000; Iglesias et al., 2006) およびカキ (Suzuki et al., 1988) において, 果実の離脱を誘起する. また, 様々なストレス条件下で引き起こされる器官離脱において, エチレンは最終的なホルモンの要因であると考えられている (Tudela and Primo, 1992). 重金属イオンがアボガドの ACC 合成酵素活性を抑制することから (Lizada and Yang, 1979), 重金属イオンはナシの花そうや花台からのエチレン発生を抑え, その結果として着果している可能性がある.

ニホンナシにおいて GA_3 , GA_4 およびホルクロルフエニユロン (CPPU) は, 開花期の花に処理すると単為結果を誘起する (猪俣ら, 1993; Zhang et al., 2008), 従って, 重金属イオンがナシの子房内の GA やサイトカイニン生成を刺激し, 着果誘起している可能性も考えられる.

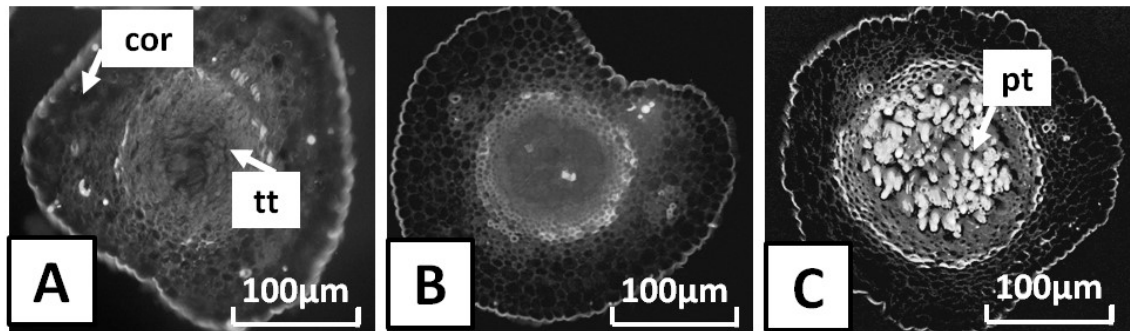


図 8. FeSO_4 (A)およびボルドー液(B)処理後の自家受粉花柱基部の断面図.

cor : 皮層

tt : 誘導組織

pt : 花粉管

他家受粉(C)花柱では多くの花粉管が見られる.

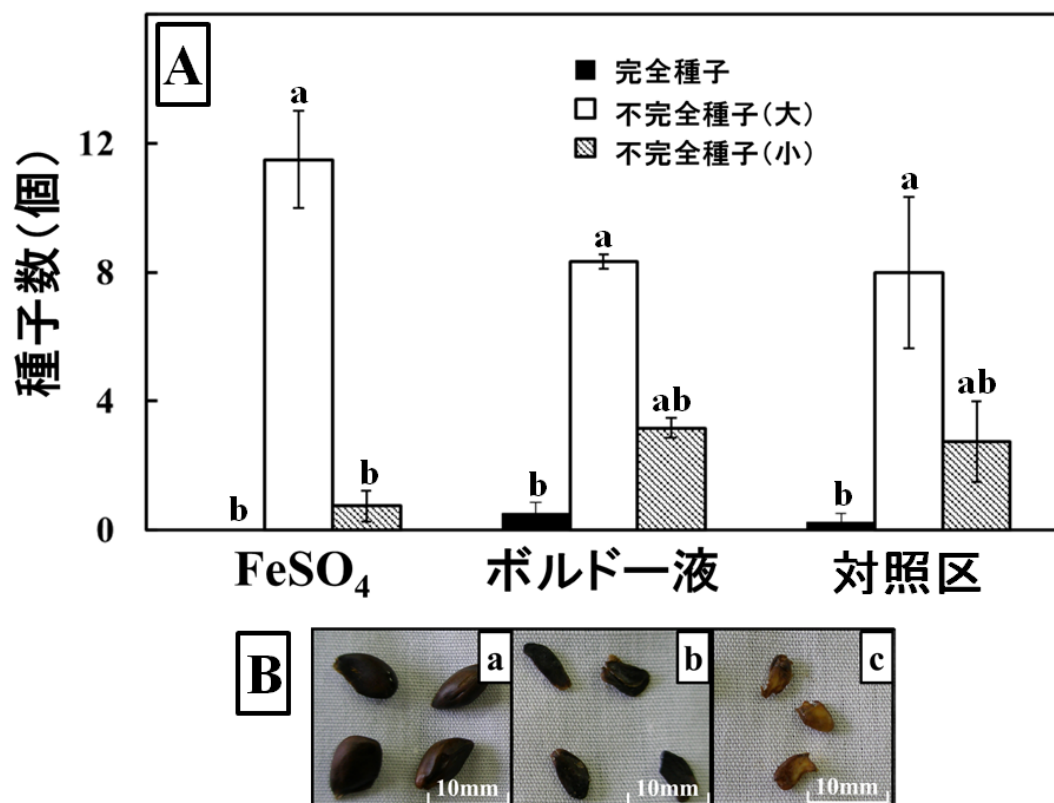


図 9A. ボルドー液および FeSO₄ 溶液によって誘起された果実内の種子.

対照区は 0.1% Tween-20 処理

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

図 9B. 収穫期の種子の様子.

a: 完全種子 b: 不完全種子 (大) c: 不完全種子 (小)

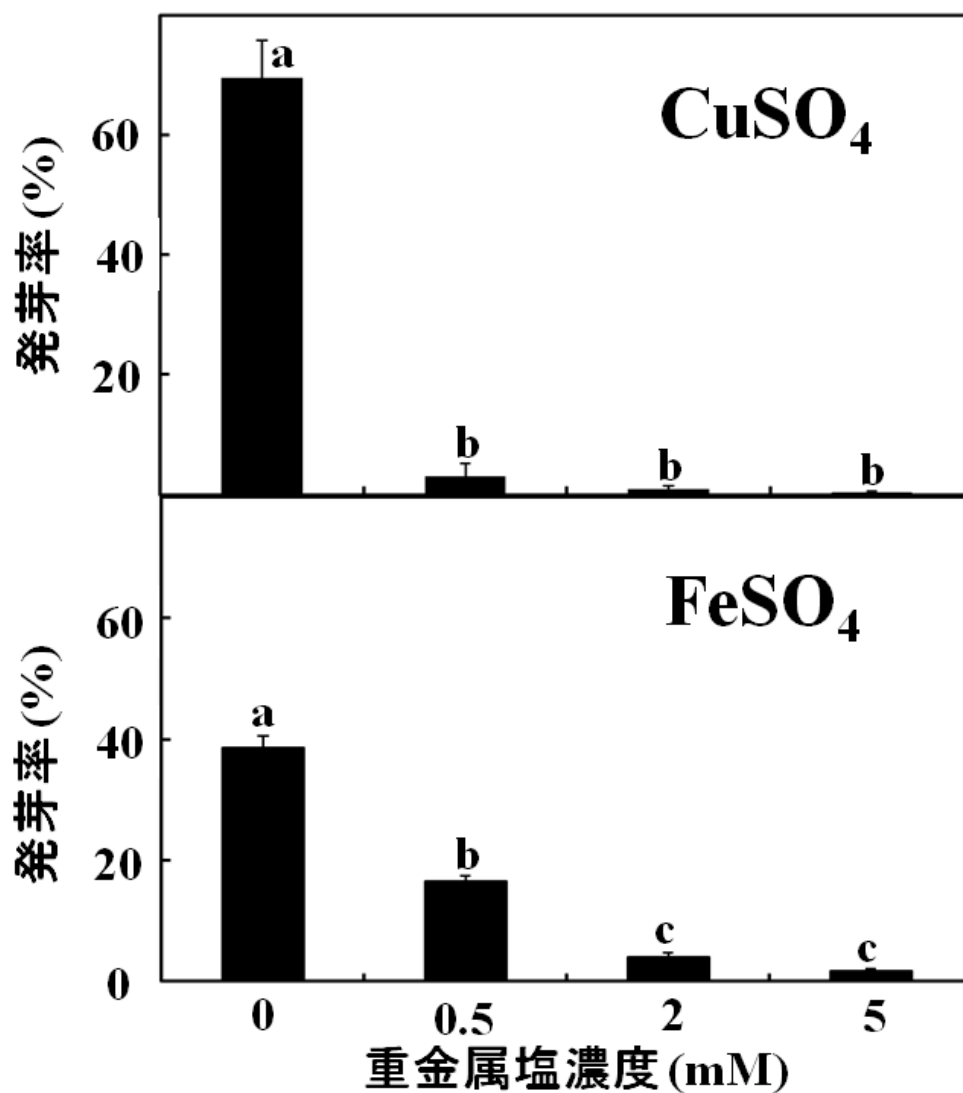


図 10. *In vitro* の花粉発芽に及ぼす CuSO₄ および FeSO₄ の影響.

花粉品種 = ‘幸水’

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5% 水準で有意差があることを示す

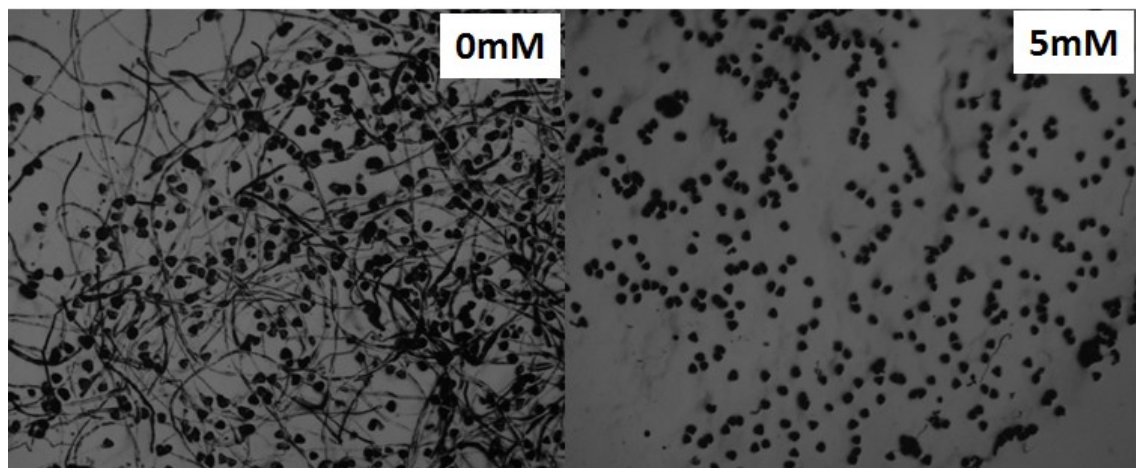


図 11. CuSO_4 が寒天培地上の花粉発芽に及ぼす影響.

花粉品種 = ‘幸水’

培地には 10% スクロース, 1% 寒天粉末および 0.01% ホウ酸を含む

第二節 重金属塩とエチレンとの関係

前節で、重金属イオンは花柱 RNase 活性を抑制するが自家不和合性を打破できず、着果は単為結果であることが確認された。しかし、重金属イオンによる着果のメカニズムは不明である。一般にエチレンは果実の落果を強く誘起する (Dal et al., 2005 ; Fukui et al., 1984 ; Gomez et al., 2000 ; Iglesias et al., 2006 ; Suzuki et al., 1988)。植物においてエチレンは、メチオニンから S-アデノシルメチオニン (SAM) および 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を経て合成される。また、SAM を ACC に変換する反応は ACC 合成酵素により触媒され、ACC からエチレンへの変換は ACC 酸化酵素によって触媒される。重金属イオンがアボガドの ACC 合成酵素活性を抑制することから (Lizada and Yang, 1979)、重金属イオンによりエチレン生成が抑制され、その結果として単為結果が生じる可能性が考えられる。さらに、落果に先立ち離層が形成され (Edgertone, 1971; MacDaniels, 1936)、離層の発達にはエチレンによって促されることから (Leopold, 1971)、重金属イオンがエチレン生成とともに離層の形成にも関与している可能性がある。

そこで本節では、着果に及ぼすエチレンおよび ACC 合成阻害剤の影響、重金属イオンが花そうからのエチレン発生および離層の発達ならびに ACC 合成酵素活性に及ぼす影響を調査した。

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植の露地‘幸水’，および，三重県農業研究所の無加温ハウス‘幸水’をそれぞれ 1 本ずつ供試した．

実験方法

－‘幸水’の着果とエチレンとの関連性－

処理区と対照区に数本の側枝をランダムに選び，全て開花 8 日前の蕾に揃えた．その蕾に，IC ボルドー 48Q，エチレン発生剤であるエスレル（100ppm），ACC 合成酵素阻害剤のアミノエトキシビニルグリシン（AVG，250ppm）を噴霧処理した．その後，花粉の混入を防ぐために花そうに袋掛けし，処理後 40 日まで経時的に着果率を調査した．各処理には 10 花そうを供試し，対照区は 0.1% Tween-20 処理とした．

－花そうからのエチレン発生に及ぼす重金属塩処理の影響－

開花 8 日前の蕾に IC ボルドー 48Q を噴霧処理し，他家受粉を防ぐために，袋掛けした．同様に袋掛けをし，処理していないものを無処理区とした．また，無袋で満開日に‘長十郎’花粉を受粉したものを他家受粉区とした．処理日から 1 週間毎に，花そうを花台ごと採取して花そうからのエチレン放出を測定した．具体的には，水で濡らしたスポンジに花台を差し込み，それを密閉した培養器で一定時間培養し，ヘッドスペースガスの 2.5mL を Unibeas A（ジーエルサイエンス，東京）を充填した SUS カラム（2m × 18mm）と FID 検出器を備えたガスクロマトグラフィー（G-3000 日立製作所，東京）

を用いて測定した．

－ 離層の形態観察 －

開花 8 日前の蕾に IC ボルドー 48Q を散布し，他家受粉を防ぐため袋掛けした．対照区は 0.1% Tween-20 とした．開花日から 3 日ごとに花そうを花台ごと切り離し，FAA で固定後，前章と同様の方法でパラフィン切片を作成した．キシレン・エタノールシリーズを介してパラフィンを融解後，ヘマトキシン溶液中で 2 時間染色し，光学顕微鏡下で花台と花梗の境界面を観察した．なお，各処理区で 5 花以上を観察した．

－ ACC 合成酵素活性に及ぼす重金属塩の影響 －

酵素液の調製

ACC 合成酵素活性測定のため，バルーンステージの蕾を花台ごと採取し，分析に用いるまで液体窒素中で保存した．そのサンプル 0.3g を 30%ポリクラール AT と 10% glycerol, 30mM ascorbate-Na, 10mM L-cysteine を含む 0.1M Tricine-KOH バッファー (pH8.5) 中で磨砕し，28,000g, 10℃, 10 分間遠心分離した．上清を硫酸アンモニウムで 100%飽和し，28,000g, 10℃, 10 分間遠心分離してタンパク質を回収した．沈殿物を Tricine-KOH バッファー (pH8.5) で溶解し，溶解液を Econo-Pac 10DC カラム (Bio-Rad, California) に通した後，溶出液は測定に用いるまで -80℃ で保存した．

ACC 合成酵素活性

0.1mM Tricine-KOH (pH8.5) バッファーにタンパク質 50μg,

20 μ M pyridoxal-5-phosphate および 400 μ M AdoMet を加え，これに CuSO₄ を 0, 0.1, 0.5, 1, 2 および 5mM となるよう添加し，Tricine-KOH バッファー（pH8.5）で全量を 1mL に調製した．これを 30℃ 1 時間インキュベートし，生成した ACC を Lizard and Yang（1979）の方法で測定した．

結果

エスレル処理区の着果率は，処理後から著しく減少して 23 日後には 4% だった（図 12）．また，ACC 合成阻害剤である AVG 処理区では高い着果率が維持され，21 日後でも 50% 程度の果実が着果していた．ボルドー処理区の着果率は，両者の中間的な値を示した．

一方，露地栽培‘幸水’の花そうからのエチレン放出量は，処理後 1 週間では違いは見られなかった（図 13）．処理後 2 週間目で，ボルドー区は 2.1nL/kgFW/h と最も高く，3 週間後では 0.7nL/kgFW/h と最も低かった．他家受粉および無処理区は，処理後 2 および 3 週間目でエチレン放出量にほとんど変化はなく，それぞれ 1 および 1.8nL/kgFW/h だった．

無加温ハウスでのボルドー区のエチレン放出量は，処理後 1 週間目で 0.5nL/kgFW/h，2 週間には 1.5nL/kgFW/h，3 週間目では 1.4nL/kgFW/h となり，3 週間目には他家受粉区と同程度で無処理区より有意に少なかった（図 14）．他家受粉区のエチレン放出量は，処理後 1～3 週間でほとんど変化はなく 0.9～1.3 nL/kgFW/h だった．無処理区のエチレン放出量は，処理 2 週間後まで大きな変化はなかったが，3 週間目に 3.75 nL/kgFW/h と急激に増加した．‘幸水’の離層帯は明確

に観察されたが，ボルドー液処理後の離層の発達は，対照区と同様で両者に特筆する違いは認められなかった（図 15）．
CuSO₄ 添加後の ACC 合成酵素活性は，0.5mM 添加で対照区の 98% となり，そこから次第に減少して 1 および 2mM で 88%，5mM では 76% となった（図 16）．

考察

‘幸水’の落果はエスレルで促進され，AVG では抑制されたことから，エチレンがナシの着果に関与するのは明白である．リンゴにおいても，エチレンが落果を促進し（Edgerton, 1971），AVG によって着果が促進されたという報告がある（Child and Williams, 1983）．一方，ボルドー液は，花そうからのエチレン発生量を減少させ，CuSO₄ によって‘幸水’花そうの ACC 合成酵素活性は抑制された．従って，ボルドー液に含まれる Cu²⁺ が ACC 合成酵素活性を阻害してエチレン発生を抑制し，着果を誘起するというメカニズムが考えられる．ボルドー液が離層の発達を抑制するという明確な証拠は得られなかったが，これはボルドー液による着果誘起率が 20～40% と低く（第 4 章），残りの 60% 以上は落果することから，ボルドー処理区でも落果するサンプルを観察していた可能性がある．この時期の着果/落果の判断は非常に難しく，この種の研究を進めるうえでの大きな障害となっている．

エチレン作用の阻害剤であるチオ硫酸銀錯塩（STS）は，重金属である銀がエチレン受容体をブロックして，花の鮮度を長持ちさせる（市村，2000）．STS と同様の受容体ブロック効果を示す 1-メチルシクロプロペン（1-MCP）処理が，‘幸

水’の着果を誘起することを確認している（データ省略）。従って、 Cu^{2+} はナシのエチレン受容体をブロックし、着果を誘起する効果を併せ持つことも考えられる。

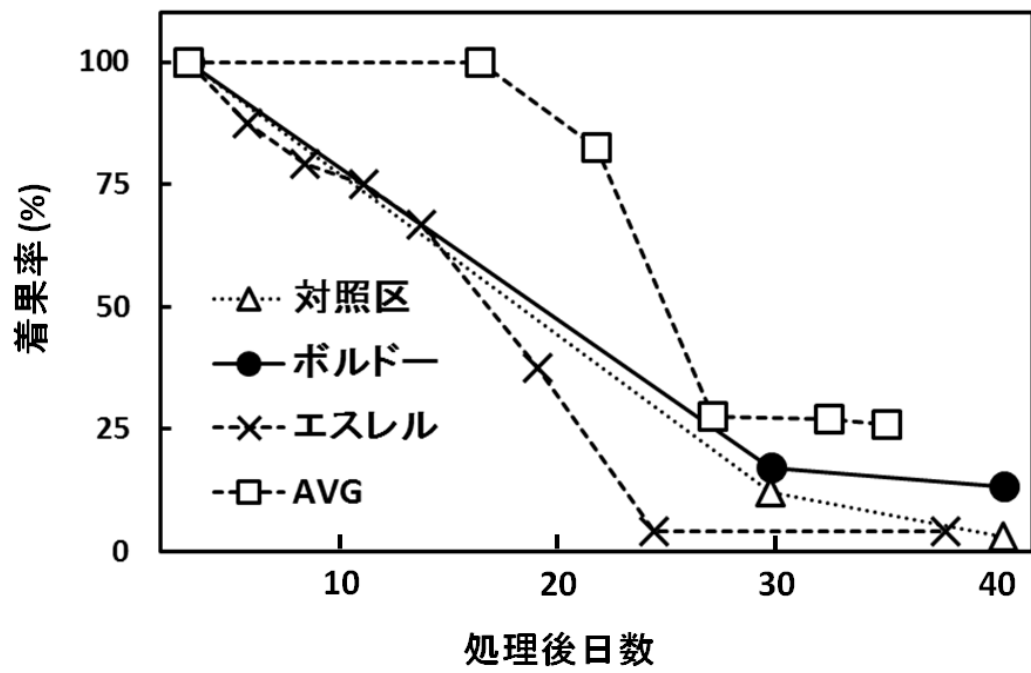


図 12. ‘幸水’ の着果に及ぼす AVG, エスレルおよび
ボルドー液処理の影響.
対照区は 0.1% Tween-20 処理

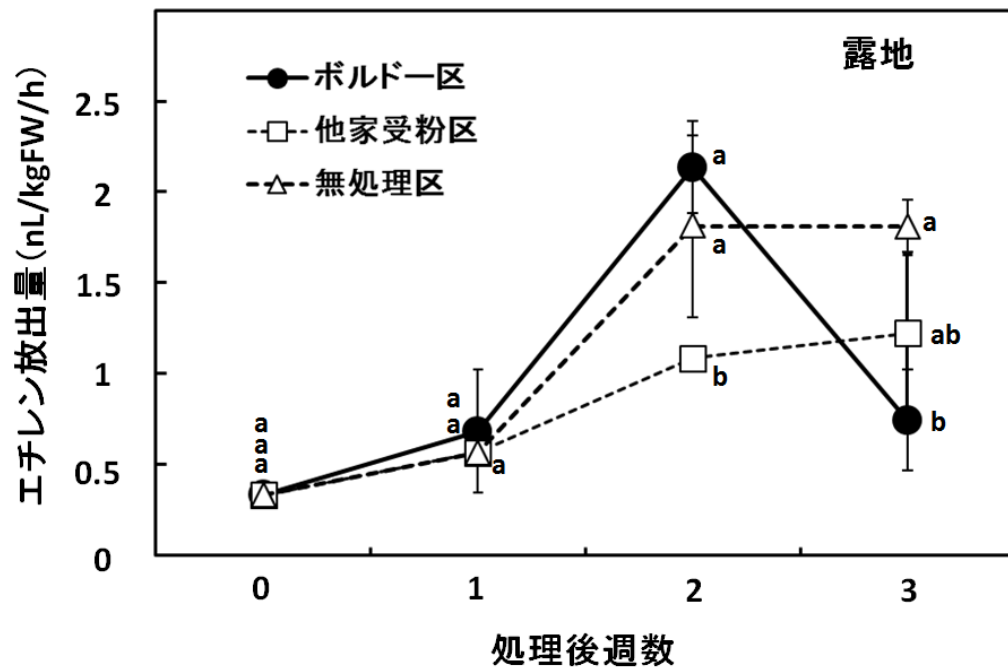


図 13. 露地「幸水」におけるボルドー液処理後の花そう
 からのエチレン放出量の経時変化.

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Duncan の多重検定により
 5%水準で有意差があることを示す

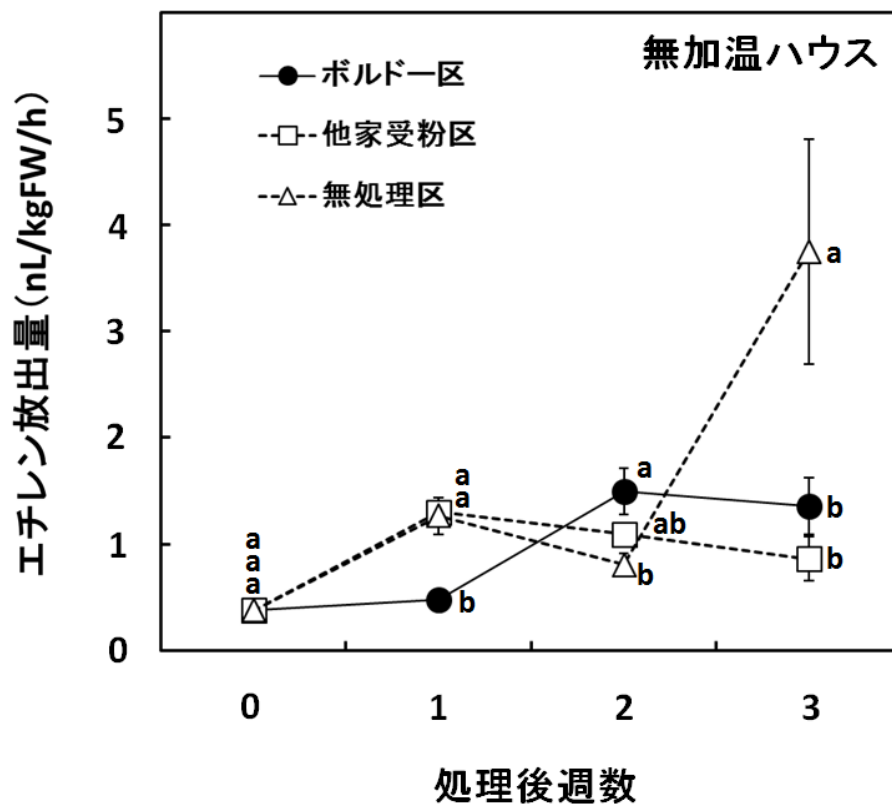


図 14. 無加温ハウス‘幸水’へのボルドー液処理の花そうからのエチレン放出量の経時変化.

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Duncan の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

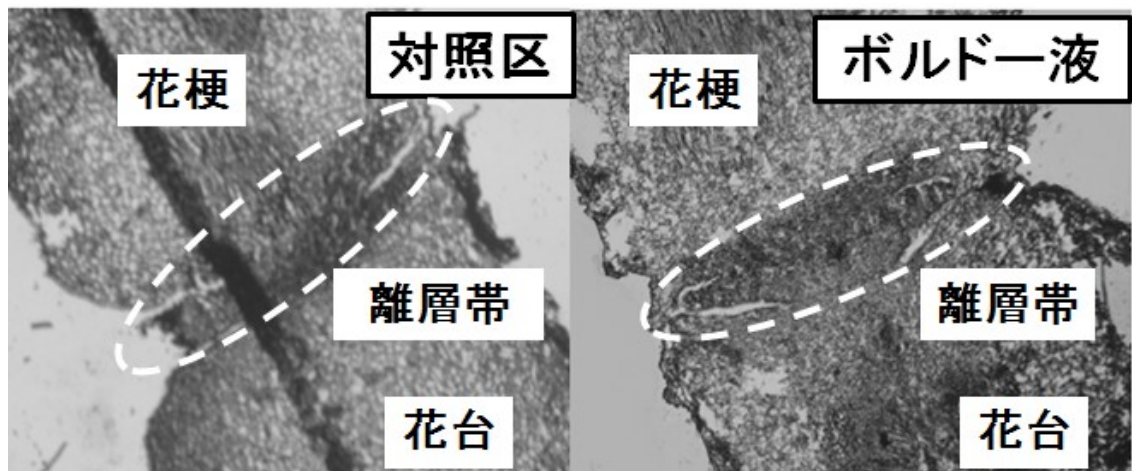


図 15. ボルドー液処理が離層の形態に及ぼす影響.

対照区は 0.1% Tween-20 処理

処理 2 週間後の様子

処理により，両者の離層形態に大きな違いは認められない

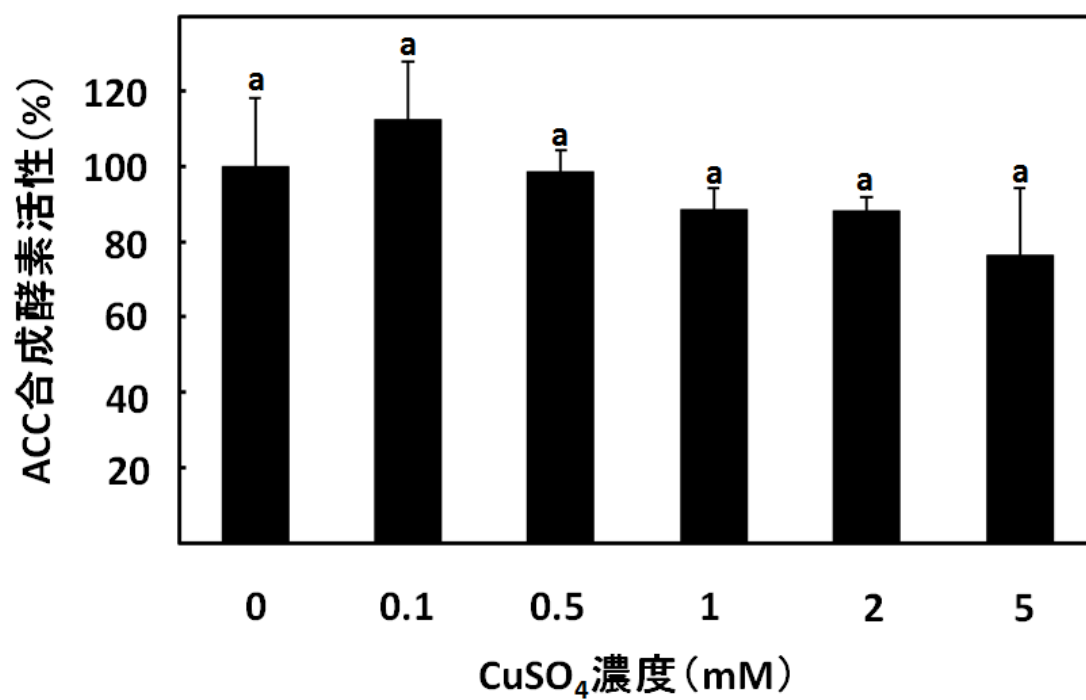


図 16. ‘幸水’花そうの ACC 合成酵素活性に及ぼす

CuSO₄ の濃度の影響.

各値は 0mM の値を 100%としたときの割合

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

第三節 雌蕊・花台による重金属イオンの吸収

前章で，重金属イオンはエチレン生成を抑制し，着果を誘起するという仮説を立てた．しかし， Cu^{2+} が花そう内の ACC 合成酵素を抑制するには， CuSO_4 として 1mM 以上の濃度が必要であり（図 16），これは Cu^{2+} として約 0.4mM の計算となる．

従って本節では，重金属イオン処理後の雌蕊・花台による Cu^{2+} と Fe^{2+} 吸収量の経日的変化を調査した．

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植の‘幸水’を 1 本供試した．

実験方法

－ Cu^{2+} および Fe^{2+} 吸収量の決定－

開花 8 日前の花に，30 倍希釈した IC ボルドー 48Q および 2mM FeSO_4 を散布した．処理 0，4，8，12 日後の花を花台ごと採取し，雌蕊と花台に分け，使用するまで液体窒素中で保存した．磁性皿にサンプル 0.3g をとり，マッフル炉に入れて 550℃で 10 時間灰化した．メスフラスコに灰化液と塩化ランタンを 1,000ppm になるように加え，再蒸留水で 5mL に定容した．定容した溶液中の Fe^{2+} および Cu^{2+} を， Fe^{2+} ， Cu^{2+} 用 HOLLOW CATHODE LAMP（浜松ホトニクス，静岡）を備えた原子吸光分光光度計（AA-6200 島津製作所，京都）で測

定した．試料中のイオン濃度は，市販の標準液の吸光度から作成した検量線より求めた．

結果

雌蕊と花台中に含まれる Fe^{2+} 濃度は，花の発育ステージが異なっても有意な変化はなく，10.3-12.2 および 8.3-11 $\mu\text{g/gFW}$ だった．一方，雌蕊の Cu^{2+} 濃度は，発育ステージが進むと若干増加し 6.5-9.3 $\mu\text{g/gFW}$ で，花台では変化がなく，3.5-5.9 $\mu\text{g/gFW}$ だった． Fe^{2+} 吸収量は，処理後 8 日に花台で 13 $\mu\text{g/gFW}$ ，雌蕊では 2.5 $\mu\text{g/gFW}$ であり，処理後日数が進むと有意に増加し，12 日後には花台で 24 $\mu\text{g/gFW}$ ，雌蕊では 11 $\mu\text{g/gFW}$ となった（図 17）．興味深いことに， FeSO_4 処理後に Cu^{2+} 濃度が増加する現象が見られた． Cu^{2+} 濃度は，処理後 12 日に有意に増加し，増加量は雌蕊で 25，花台で 19 $\mu\text{g/gFW}$ であった（図 18）．

ボルドー液処理後の Cu^{2+} 吸収量は，処理後 4 日に花台で 3.7 $\mu\text{g/gFW}$ ，雌蕊では 6.7 $\mu\text{g/gFW}$ であり，処理後 12 日の花台と雌蕊はともに約 13.1 $\mu\text{g/gFW}$ と有意に増加した（図 19）．また，ボルドー液処理後の Fe^{2+} 濃度も増加し，処理後 12 日の花台の増加量は約 20，雌蕊では 16 $\mu\text{g/gFW}$ となった（図 20）．

考察

処理した重金属イオンは，雌蕊・花台内に吸収されており，花台は雌蕊よりこれらの金属を吸収し易い傾向があった．処理後に吸収された Fe^{2+} と Cu^{2+} は，それぞれ 12 日後に 24（雌

蕊では 11) および $13\mu\text{g/gFW}$ であり，これにもとから含まれていた量を加えるそれぞれの濃度は 0.09 (雌蕊では 0.06) と 0.04mM (雌蕊では 0.06) という計算となる．図 16 より，これらのイオン濃度ではナシ花そう内の ACC 合成酵素活性を抑制することはできず，処理した重金属イオンが直接エチレン合成を阻害するという証明は得られなかった．従って，前述したように，重金属イオンはエチレンレセプターをブロックしているのかもしれない．興味深いことに， FeSO_4 処理後に Cu^{2+} が，ボルドー液処理後に Fe^{2+} 濃度が増加したことから，花器内では重金属イオン間で相加作用が生じ，全重金属イオン濃度はかなり高くなる．単為結果誘起には，こういった作用が関与している可能性も考えられる．

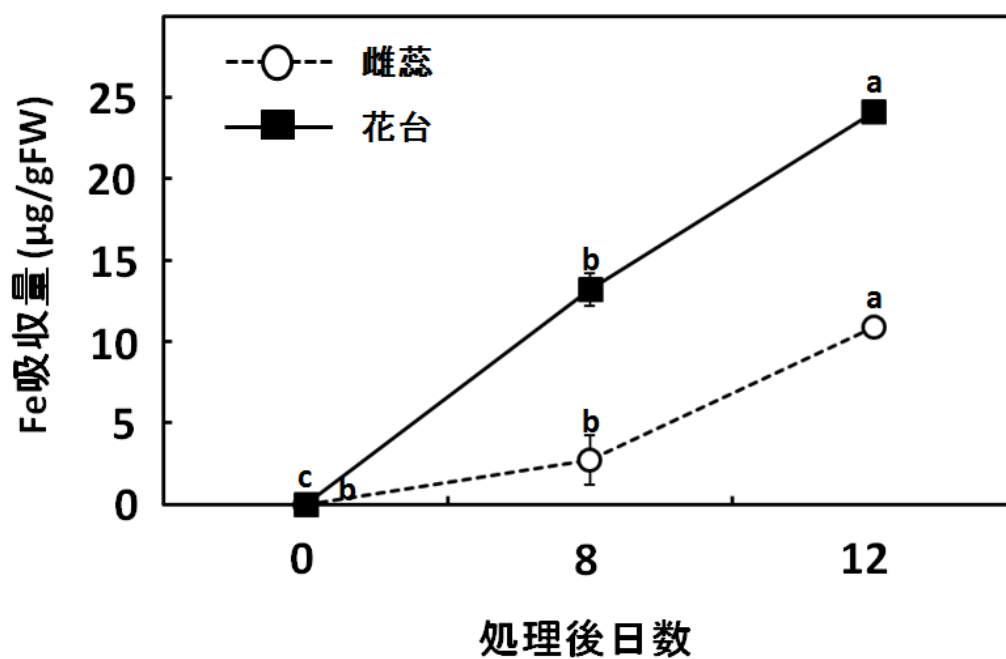


図 17. FeSO_4 処理後の雌蕊・花台による Fe^{2+} 吸収の変化.

縦線は標準誤差を示す

同じ組織の異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す
有意差検定は, 同じ組織の処理後日数間で行った

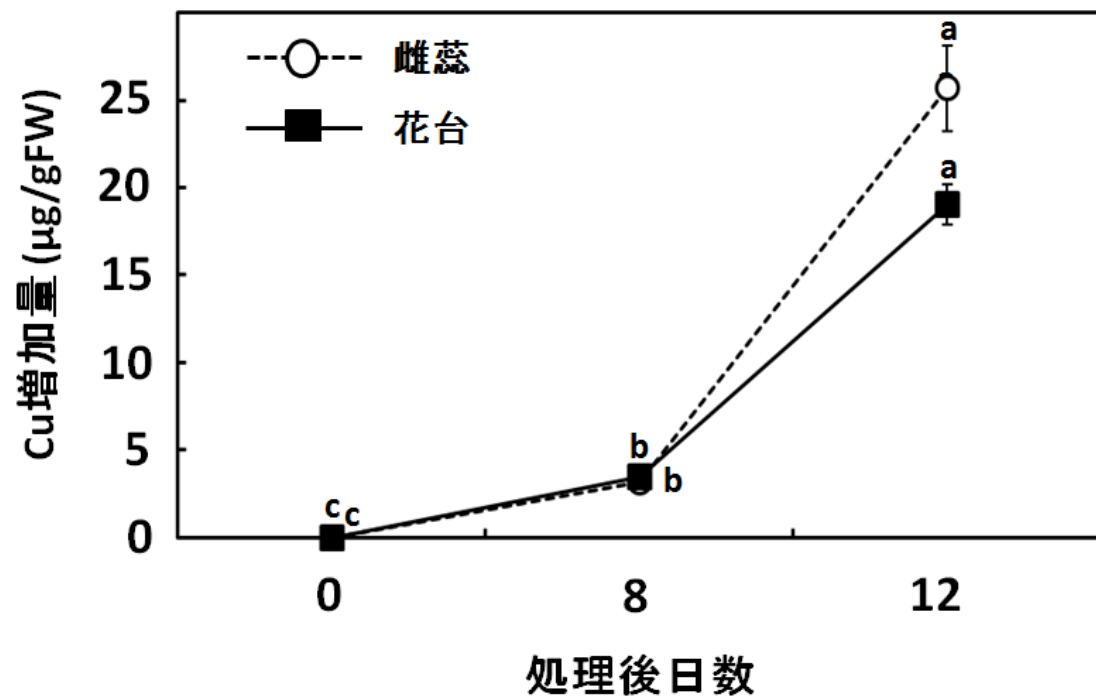


図 18. FeSO_4 処理後の雌蕊・花台内における Cu^{2+} の増加.

縦線は標準誤差を示す

同じ組織の異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す
有意差検定は, 同じ組織の処理後日数間で行った

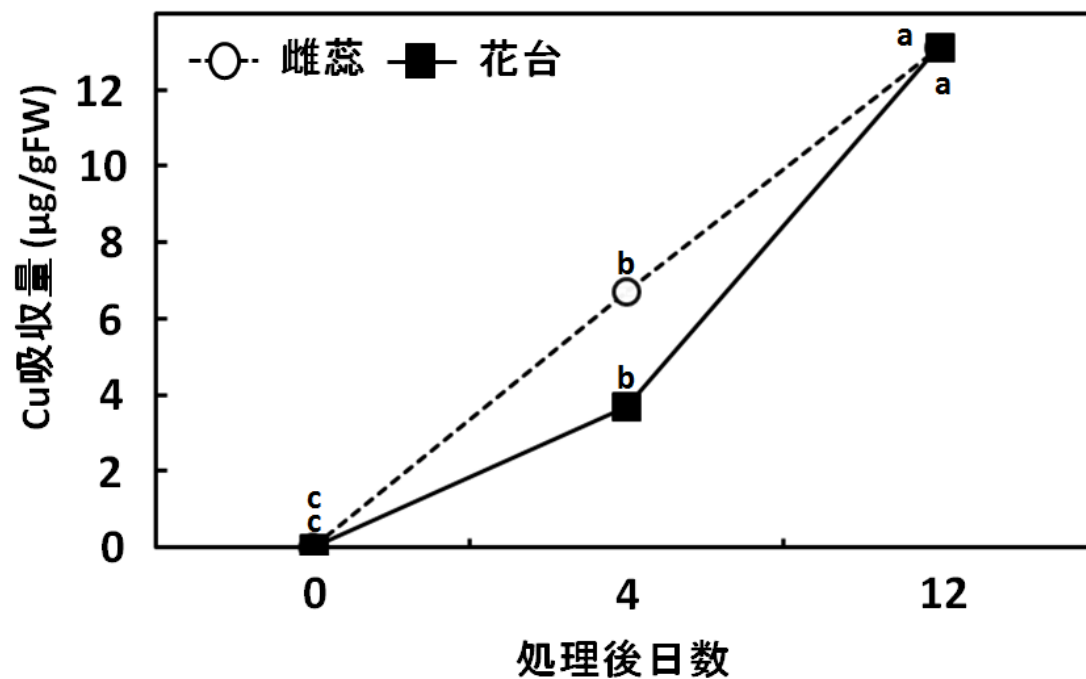


図 19. ボルドー液処理後の雌蕊・花台による Cu^{2+} 吸収量の変化。

縦線は標準誤差を示す

同じ組織の異なるアルファベット間には，Tukey-Kramerの多重検定により 5%水準で有意差があることを示す
有意差検定は，同じ組織の処理後日数間で行った

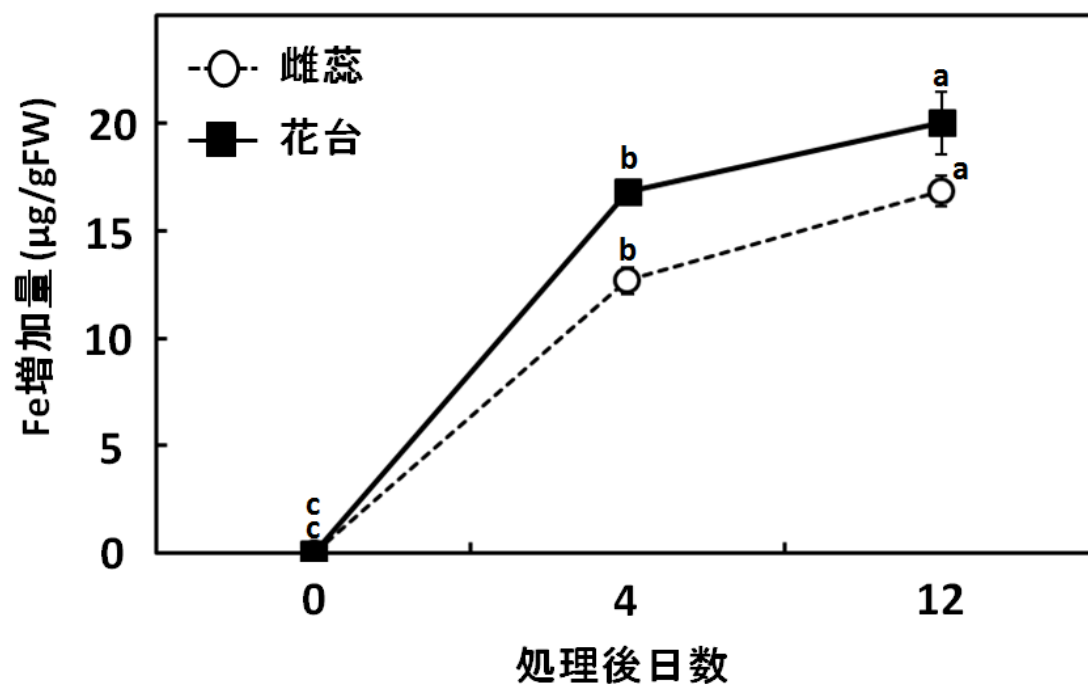


図 20. ボルドー液処理後の雌蕊・花台内における Fe^{2+} の増加.

縦線は標準誤差を示す

同じ組織の異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す
有意差検定は, 同じ組織の処理後日数間で行った

第三章 重金属イオンによる着果誘起の品種間差

第一節 品種間差の確認

前章までにおいて，重金属イオンが‘幸水’の単為結果を誘起することは確認できたが，他のニホンナシ品種での効果は不明である．また，反応性の違いが認められれば，重金属イオンによる着果誘起のメカニズム解明につながるかもしれない．

そこで本節では，農場で利用できるニホンナシ数品種を用い，重金属塩処理による着果誘起効果の品種間差を調査した．また，品種間差の原因を解明するためのいくつかの実験を試みた．さらに，ニホンナシの自家不和合性には品種間で強弱があるため（張，1999），着果誘起率と自家不和合性の強さとの関連性についても調査した．

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植の‘幸水’，‘秀玉’，‘八里’，‘喜水’，‘長十郎’，‘豊水’，‘ゴールド二十世紀’，‘筑水’の成木1本ずつを用いた．

実験方法

－着果率調査－

各品種の開花8日前の花に，0.1% Tween-20を含むICボルドー48Qおよび2mM FeSO₄を噴霧処理し，他家受粉を防

ぐための袋掛けをした．開花 4 週間後に着果率を調査した．
これらの実験には，それぞれの品種で 70 花以上供試した．

－花柱タンパク質の抽出－

各品種のバルーンステージの花を採取し，花柱を分離後，使用するまで液体窒素中で保存した．花柱タンパク質の抽出は，第一章に準じた．氷上で，花柱重量の 30% のポリクラール AT を含む抽出バッファー [150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM Na₂-EDTA, 10mM L-cysteine, 1mM L-ascorbic acid 0.01M KCl を含む 50mM Tris-HCl バッファー (pH8.4)] 中で花柱をホモジナイズし，これを 16,000g, 4℃ で 10 分間遠心分離し，上清を Sephadex G-25 カラムに通してポリフェノールを除去した．得られたタンパク質に 100% 飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加し，30 分間静置した．その後，16,000g, 4℃ で 10 分間遠心分離してタンパク質を沈殿させた．得られたタンパク質沈殿物を少量の 50mM Tris-HCl バッファー (pH8.4) で溶解後，実験に用いるまで -30℃ で保存した．タンパク濃度は，Bradford 法 (1976) により決定した．

－RNase 活性の測定－

第一章と同じ方法で行った．測定は Brown and Ho (1986) の方法に従い，50μg の花柱タンパク質，500μL の 4mg/mL torula yeast RNA，および CuSO₄ または FeSO₄ が反応液中に 1mM になるように添加し，50mM Tris-HCl バッファー (pH8.4) で総量を 750μL に調整した．これを 55℃，30 分間インキュベートし，反応を停止させるために 20% トリクロ

ロ酢酸を 250 μ L 加えた．これを 20,000g で 10 分間遠心分離し，上清を 100 倍希釈して分光光度計（UV-1800 島津製作所，東京）を用いて OD260 を測定した．対照区には，花柱タンパク質の代りにバッファを同量加え，以下すべて同じ条件とした．

結果

FeSO₄ 処理は，‘幸水’で 38%，‘秀玉’では 44%の高い着果誘起効果を示したが，‘八里’，‘喜水’および‘長十郎’ではそれぞれ 6，5 および 3%と低く，‘豊水’，‘ゴールド二十世紀’および‘筑水’では全く着果しなかった（図 21）．ボルドー液処理の効果は FeSO₄ と同様の傾向を示し，‘幸水’と‘秀玉’で高く，‘八里’，‘喜水’および‘長十郎’で低い結果となった（図 22）．

一方，Fe²⁺による花柱 RNase への反応は，‘幸水’で対照区の 92%と最も抑制され，‘秀玉’では 143%と促進された（図 23）．‘幸水’以外の品種では，Fe²⁺は RNase を活性化させた．

Cu²⁺は，全ての品種の花柱 RNase 活性を抑制した．Cu²⁺による活性抑制は，着果しにくい‘喜水’で対照区の 48%と最も弱く，‘長十郎’では 9%と最も強かった（図 24）．

各品種の重金属イオンによる着果誘起率と RNase 活性抑制程度，ならびに自家不和合性の強さとの関連性を調査したが，相関は見られなかった（図 25,26）．一方，CuSO₄による花柱 RNase 活性抑制程度と自家不和合性の強さとの間に，有意な正の相関が見られた（図 27）．

考察

Cu^{2+} および Fe^{2+} による着果促進効果には、明らかな品種間差が認められた。重金属イオンによって高い着果が見られたのは‘幸水’と‘秀玉’であり、両品種とも‘二十世紀’を先祖にもつことから、当初は重金属イオンによる単為結果性は‘二十世紀’由来の形質と考えた。しかし、同じ‘二十世紀’を祖先とする‘筑水’、‘豊水’、‘ゴールド二十世紀’は全く結実しないことより、この性質は‘二十世紀’から受け継いだものではない。‘秀玉’は‘幸水’と‘菊水’の交配から得られた品種であることから、むしろこの形質は‘幸水’または‘幸水’のもう片方の祖先である‘太白’や‘早生幸蔵’の品種特性に由来するものと推察された。重金属イオンによる着果と花柱 RNase 活性抑制程度の間に関連は見られなかったことから、花柱 RNase 活性抑制と着果は関係ないことが再度確認された。

一方、各品種の自家不和合性の強さと着果との間に関係性は確認できなかったが、 CuSO_4 による花柱 RNase 活性抑制程度との間に有意な正の相関が見られた。つまり、自家不和合性が強い品種ほど、 Cu^{2+} によって花柱 RNase 活性は抑制される。 Cu^{2+} は花柱 RNase 活性を抑制するにもかかわらず、自家不和合性を打破しないことより、 Cu^{2+} は自家不和合性とは無関係の *non-S-RNase* を抑制していると推察される。自家不和合性の強さの品種間差は、S 遺伝子が支配する形質ではないと考えられることから、この品種間差には *non-S-RNase* の活性が関与しているのかもしれない。

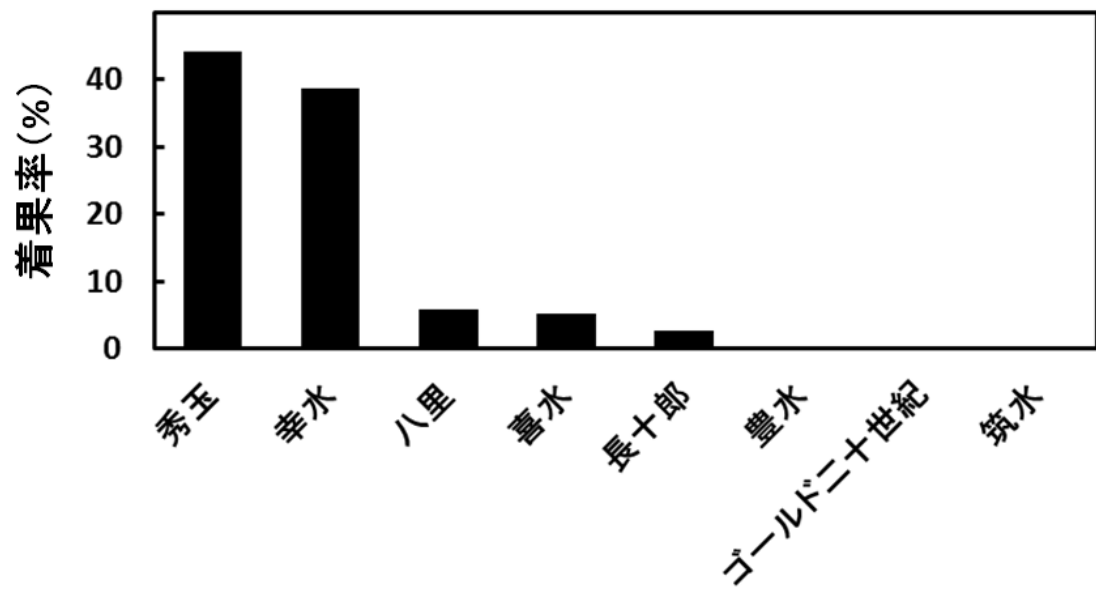


図 21. FeSO_4 による着果誘起の品種間差.

2mM FeSO_4 を開花 8 日前に散布

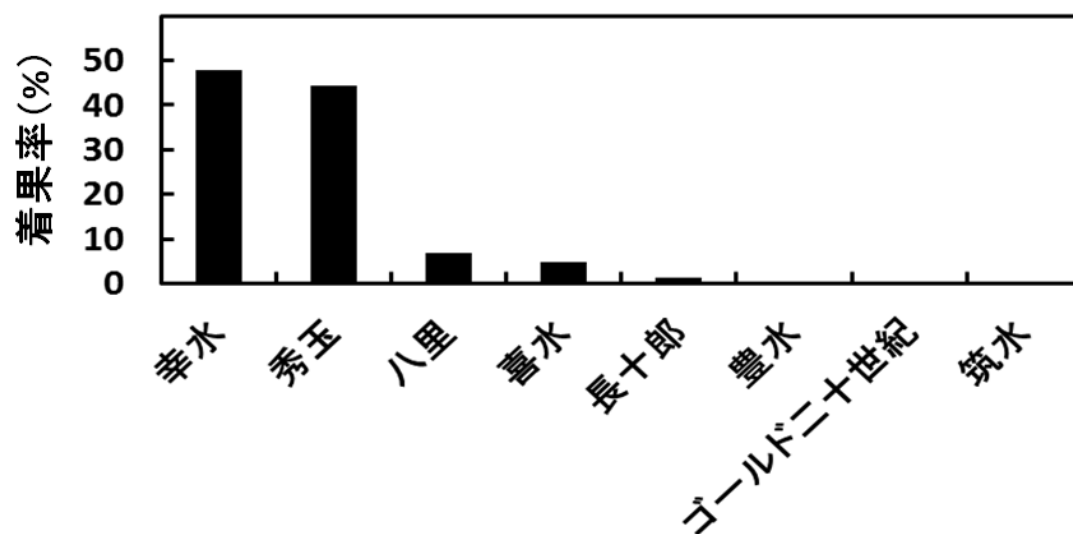


図 22. ボルドー液による着果誘起の品種間差.

IC ボルドー 48Q を開花 8 日前に散布

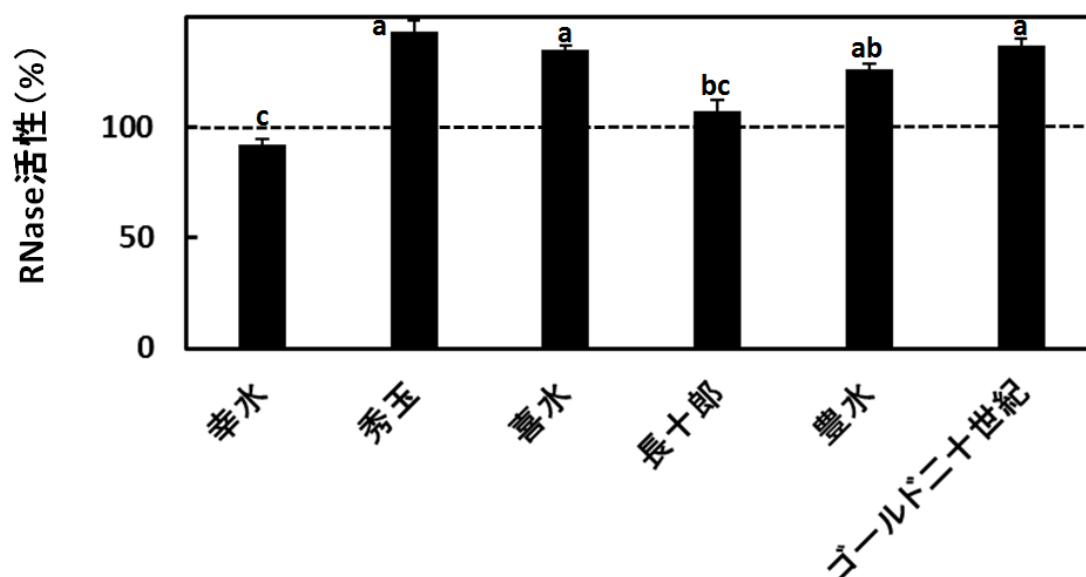


図 23. FeSO_4 が各品種の花柱 RNase 活性に及ぼす影響.

各値は対照区を 100%としたときの割合

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

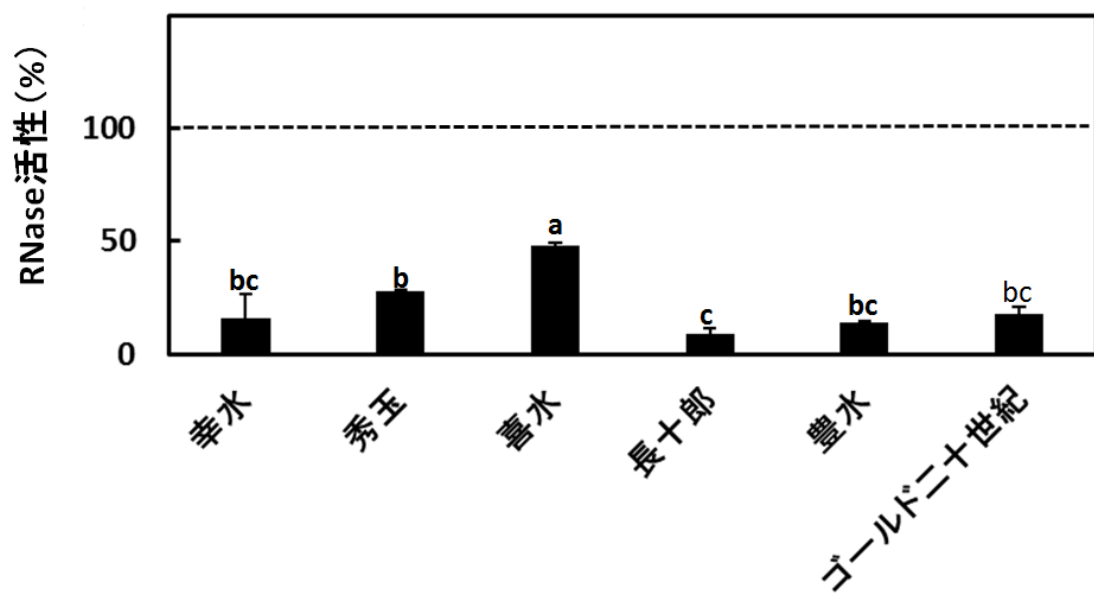


図 24. CuSO_4 による花柱 RNase 活性抑制の品種間差.

各値は対照区を 100%としたときの割合

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

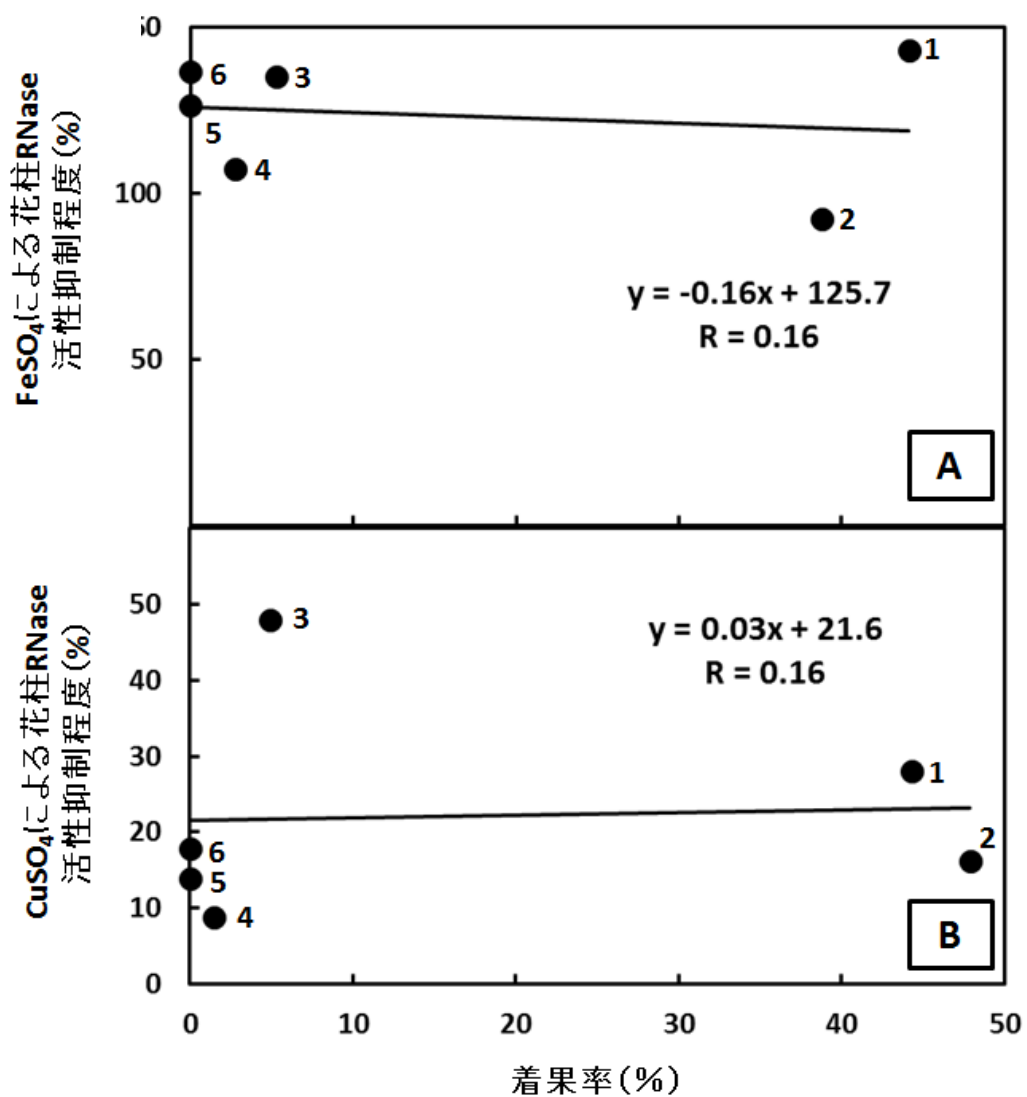


図 25. FeSO₄ (A) およびボルドー液 (B) による着果誘起と花柱 RNase 活性抑制との関係.

1= '秀玉', 2= '幸水', 3= '喜水', 4= '長十郎',
5= '豊水' および 6= 'ゴールド二十世紀'

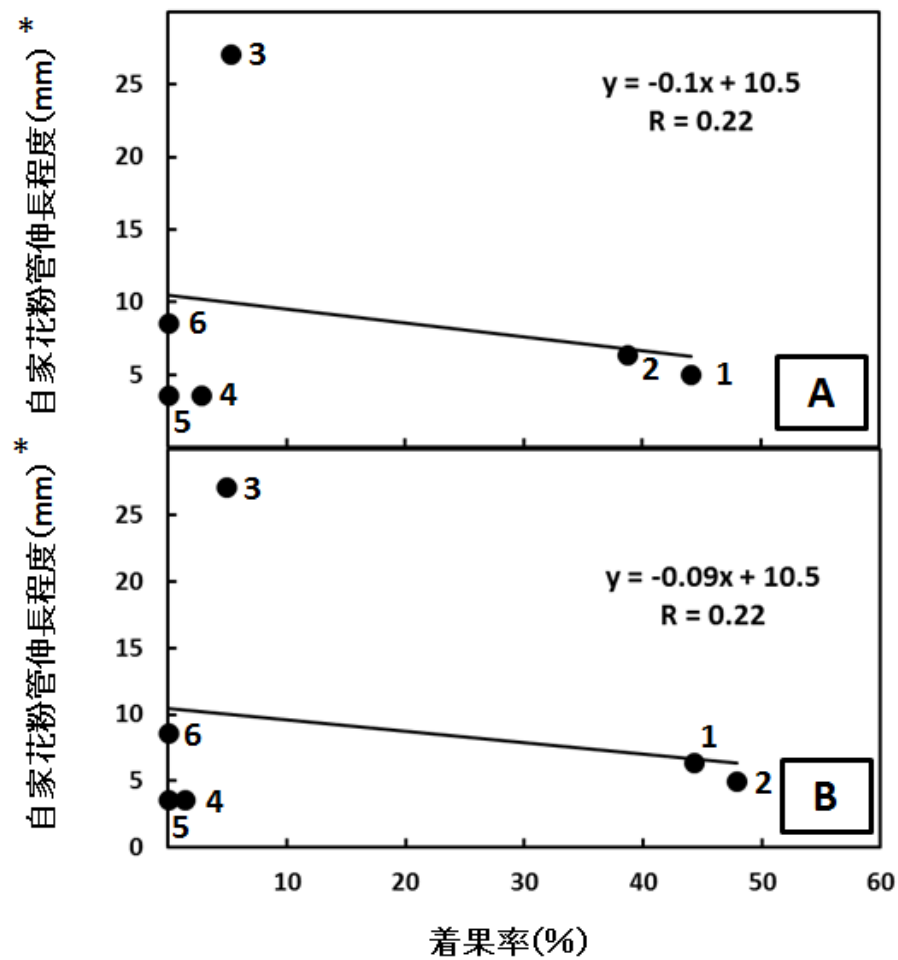


図 26. FeSO₄ (A) およびボルドー液 (B) による着果誘起

と自家不和合性の強さとの関係。

1= '秀玉', 2= '幸水', 3= '喜水', 4= '長十郎',
5= '豊水' および 6= 'ゴールド二十世紀'

*自家花粉管伸長程度が小さいほど不和合性は強い

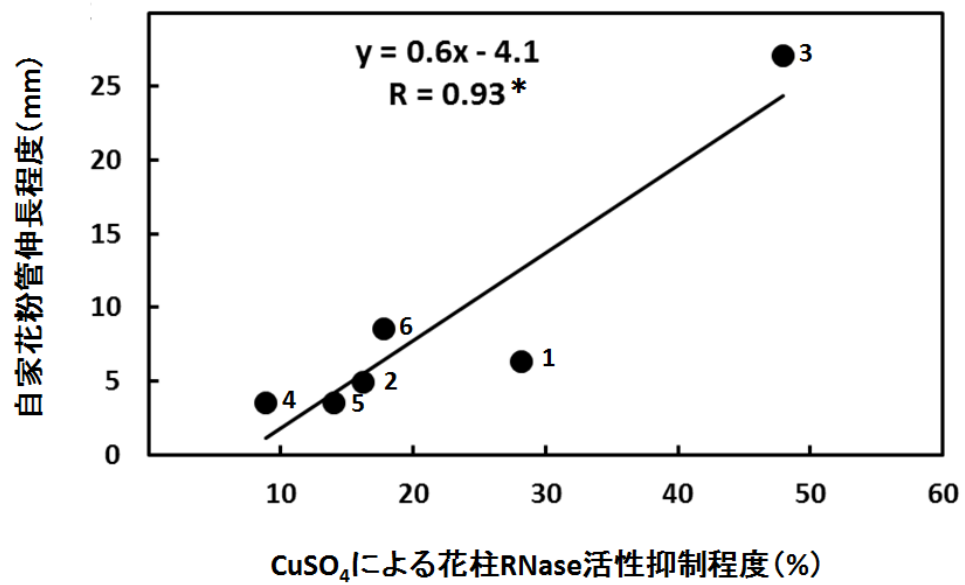


図 27. 自家不和合性の強さと CuSO_4 による花柱 RNase 活性抑制との関係.

1 = ‘秀玉’, 2 = ‘幸水’, 3 = ‘喜水’, 4 = ‘長十郎’,
5 = ‘豊水’ および 6 = ‘ゴールド二十世紀’

自家花粉管伸長程度が小さいほど不和合性は強い

*Student の t 検定によって 5%水準で有意差あり

第二節 着果と内生重金属イオンとの関係

前節で、重金属イオンによる着果誘起には品種間差があり、この現象は重金属イオンによる花柱 RNase 活性抑制程度では説明できなかった。しかし、活性抑制と自家不和合性の強さとの間に相関があるという、興味深い実験結果を得た。本節では、重金属イオンによる着果誘起の品種間差と花器の内生重金属イオン濃度との関係を検討するとともに、重金属イオン濃度と自家不和合性の強さとの関連についても検討した。

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植のニホンナシ‘幸水’，‘秀玉’，‘八里’，‘喜水’，‘長十郎’，‘豊水’，‘ゴールド二十世紀’の成木 1 本ずつを用いた。

実験方法

－雌蕊・花台の Fe^{2+} ， Cu^{2+} 含量調査－

バルーンステージの各品種の花を花台ごと採取し、雌蕊と花台に分けて使用するまで液体窒素中で保存した。各品種の重金属イオン含量は、第二章と同じ方法で測定した。磁性皿にサンプル 0.3g をとり、マッフル炉に入れて 550°C で 10 時間灰化した。メスフラスコに灰化液と塩化ランタンを 1,000ppm になるように加え、再蒸留水で 5mL に定容した。定容した溶液中の Fe^{2+} および Cu^{2+} を、 Fe^{2+} と Cu^{2+} 用 HOLLOW CATHODE LAMP（浜松ホトニクス，静岡）を備え

た原子吸光分光光度計（AA-6200 島津製作所，京都）で測定した．試料中のイオン濃度は，市販の標準液の吸光度から作成した検量線より求めた．

結果

雌蕊の Fe^{2+} 濃度には統計的に有意な品種間差はなかったが，着果し易い‘秀玉’が $15\mu\text{g/gFW}$ と最も高く，着果率が下がるのに伴って Fe^{2+} 含量は減少し，着果しない‘ゴールド二十世紀’では $8\mu\text{g/gFW}$ と最も低かった（図 28）．花台の Fe^{2+} 含量の品種間差は有意であり， $4.7\sim 16\mu\text{g/gFW}$ であった．着果しやすい‘秀玉’で最も高く，着果しにくい‘長十郎’では最も低かったが，着果率との相関は認められなかった（図 30）．

雌蕊の Cu^{2+} 濃度には統計的に有意な品種間差が認められ，着果し易い‘幸水’と‘秀玉’でそれぞれ 8.3 および $11\mu\text{g/gFW}$ と高く，着果しにくい‘喜水’と‘長十郎’ではそれぞれ 9.3 および $4.6\mu\text{g/gFW}$ と低く，着果しない‘豊水’と‘ゴールド二十世紀’ではそれぞれ 10 および $6.5\mu\text{g/gFW}$ だった（図 29）．花台の Cu^{2+} 含量は有意に異なり，品種間で $4\sim 9\mu\text{g/gFW}$ の値を示した．しかし，ボルドー液による着果誘起率と花器内の Cu^{2+} 濃度との間に有意な相関は見られなかった（図 30）．

考察

花台の Fe^{2+} および雌蕊と花台の Cu^{2+} 含量は，品種によって有意に異なった．重金属イオンによる着果誘起の品種間差は，

内生重金属含量の違いに起因すると考えたが，両者の間に有意な相関は見られなかった．従って，重金属イオンによる着果誘起は‘幸水’が有する品種特性に起因するという前述の推察を支持する結果となった．但し，統計的に有意性はないものの，雌蕊・花台ともに着果し易い品種は重金属イオン濃度が高い傾向にあったことより，供試品種数を増やして精密な解析を行えば，両者の関係を証明できるかもしれない．

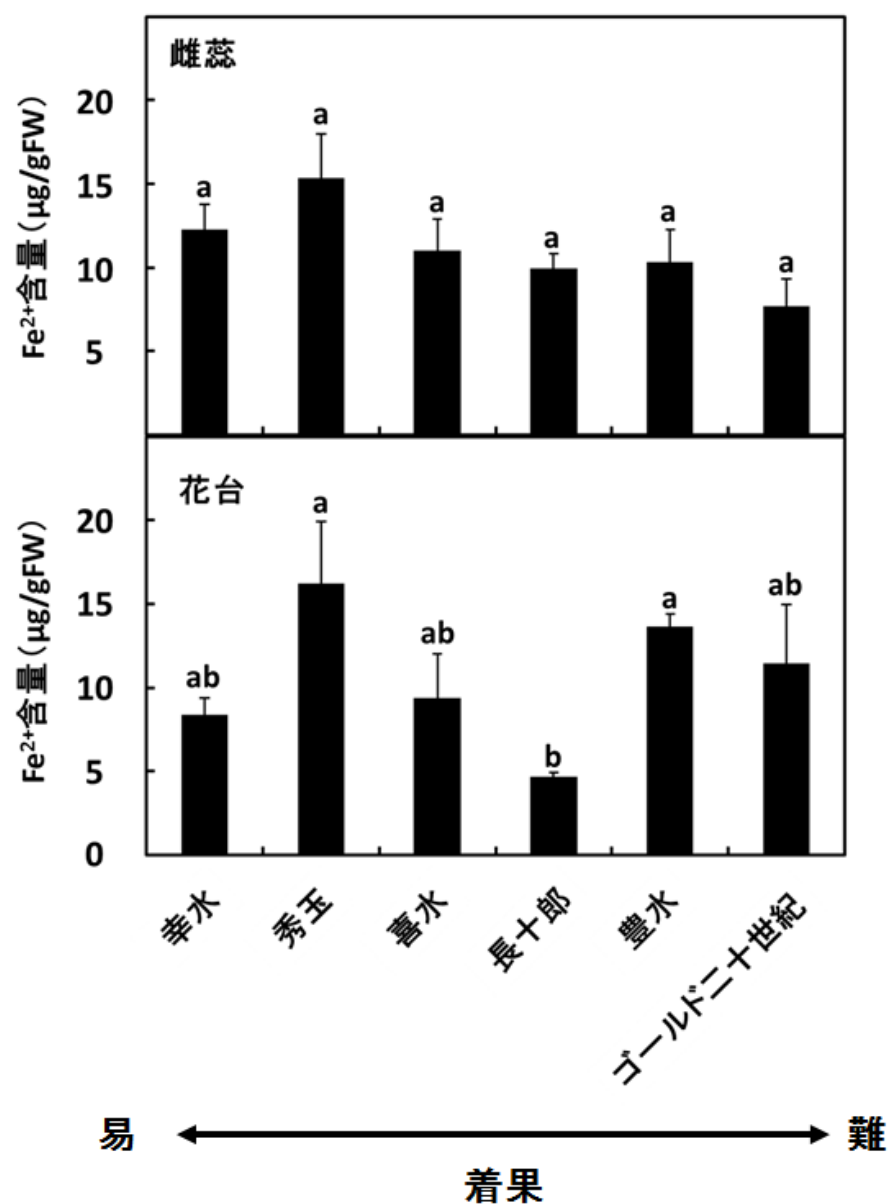


図 28. バルーンステージの雌蕊・花台内における

Fe^{2+} 含量の品種間差.

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

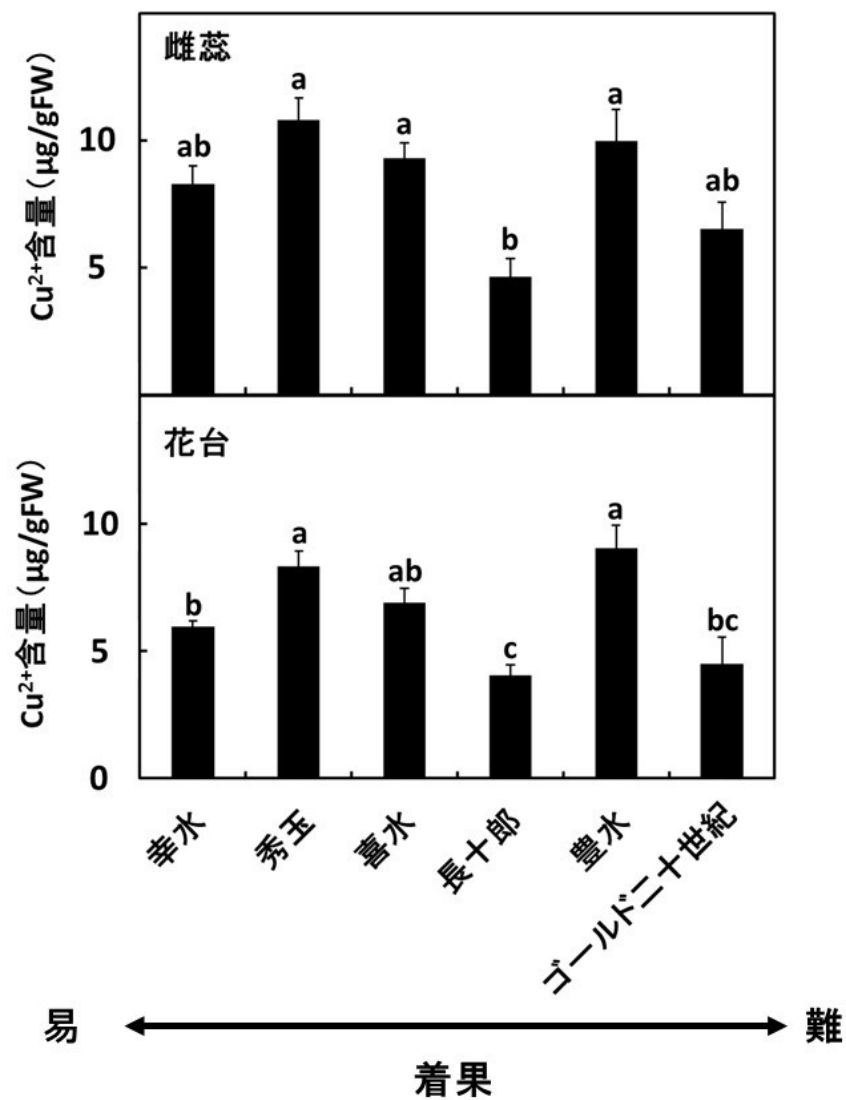


図 29. バルーンステージの雌蕊・花台内における

Cu^{2+} 含量の品種間差.

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

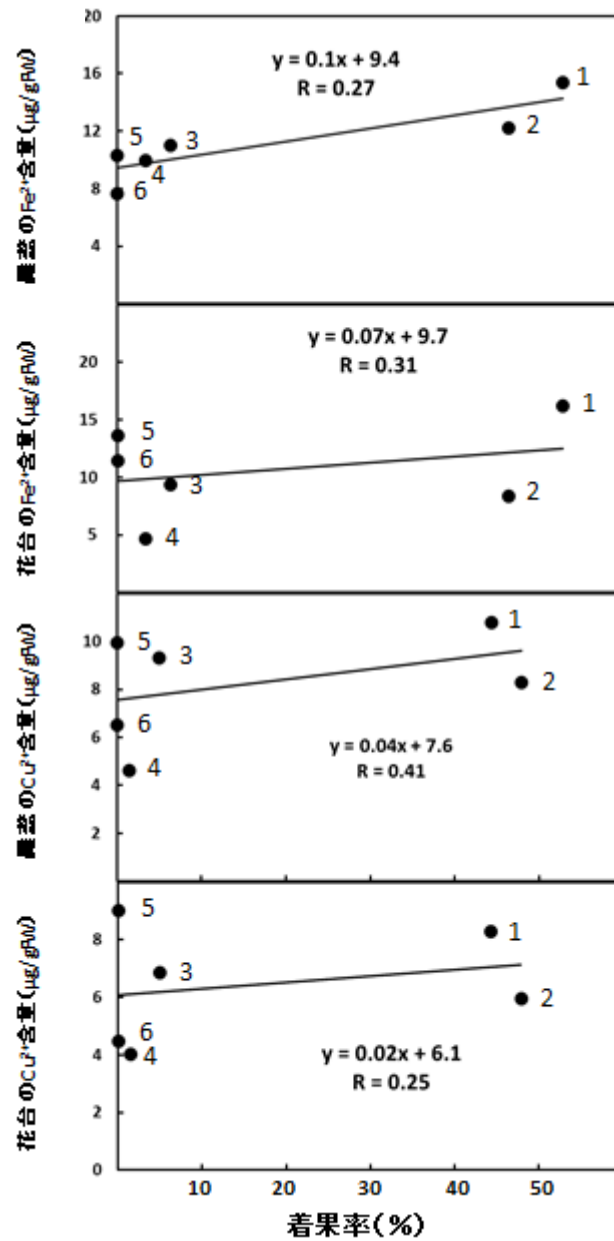


図 30. 重金属塩による着果誘起と雌蕊・花台の Fe^{2+} および Cu^{2+} 含量との関係.

1 = '秀玉', 2 = '幸水', 3 = '喜水', 4 = '長十郎',
5 = '豊水' および 6 = 'ゴールド二十世紀'

第四章 ボルドー液による‘幸水’の着果誘起および 果実肥大

第一節 ボルドー液による着果誘起

日本のナシ栽培において、人工受粉および摘果作業は、商業的果実を得るためには必須である。しかし、これらはナシ栽培の総作業時間の 1/4 を占め、季節的な制限がある。果実生産に必要な幼果は咲いた花の約 5%であるので（平塚ら，2002），20%程度の着果率を確保できれば摘果はほぼ不要となる。前章で、開花前の‘幸水’へのボルドー液処理は 20 %前後の着果を誘起することから、人工受粉が不要で、摘果作業を大幅に短縮できる栽培法が確立できる可能性がある。さらにボルドー液は、開花前の病害防除を兼ねることができるため、大幅な省力化が可能となる。

そこで本節では、ニホンナシの開花前黒斑病・黒星病防除剤として登録のある IC ボルドー48Q の着果誘起効果を確認するとともに、実用化に向けた幾つかの問題点の克服を試みた。

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植の‘幸水’1本を供試した。

実験方法

ー ボルドー液の処理適期 ー

萌芽期処理を除いて，ステージの異なる花は除去し，処理する花のステージを揃えた．萌芽期，開花 8,4 日前および開花 0,4 日後の蕾に，展着剤として 0.1%の Tween - 20 を含む IC ボルドー 48Q を噴霧処理した．対照区として，0.1% Tween - 20 を処理した．開花前処理では，ボルドー液を噴霧した後に袋掛けをし，開花 0 日処理は開花直前の花に処理し，袋掛けした．開花 4 日後処理では，蕾を袋で覆って開花 4 日後に処理を行い，再び袋掛けした．全ての区において，開花 4 週間後に着果率を調査した．少なくとも各処理に 70 花を使用し，同様に結実を誘起する FeSO_4 についても処理を行って参考データとした．

ー ボルドー液処理による着果誘起の年次変動 ー

ボルドー液処理による着果誘起に年次間差があるか調査するため，2008 年から 2013 年の 6 年間にわたって開花 8 日前の蕾に IC ボルドー 48Q を処理した．各年とも着果率は，開花 4 週間後に調査した．実験には各年 70 花以上を使用し，同様に結実を誘起する FeSO_4 処理を参考として行った．

ー 他家受粉した花の着果に及ぼすボルドー液処理の影響 ー

ボルドー液処理が他家受粉した花の着果を抑制するかを知るため，開花 8 日前に処理した花の開花期に‘長十郎’ (S_2S_3) 花粉を受粉し，4 週間後に着果率を調査した．実験には少なくとも 70 花を使用した．

結果

ボルドー液は，萌芽期～開花 4 日後の間で 23～56%と十分な着果を誘起し，開花 8 日前の着果率が最も高かった（図 31）．また，開花 8 日前に処理した 6 年間のボルドー液による着果誘起率は 15～56%と変動した（図 32）．

一方， FeSO_4 は萌芽期～開花 0 日処理で 12～45%となり，開花当日処理では着果率の低いことがボルドー処理と異なった．6 年間の FeSO_4 による着果誘起率の変動は，17～39%となった．他方，ボルドー液処理した花の他家受粉による着果率は 70%を示し，処理していない他家受粉区と同じ着果率だった（図 33）．

考察

‘幸水’へのボルドー液処理は， CuSO_4 と同様に着果を誘起した．従って，慣行栽培で使っている開花前の化学農薬の代わりにボルドー液を利用すれば，黒斑・黒星病防除と着果誘起を同時に達成できる．また，ボルドー液は，開花前 8～0 日の間に効果的に着果を誘起したため，処理適期はこの間と判断された．但し，着果率が高すぎる場合は処理適期を前後に移動させることにより，理想に近い着果率が得られるものと思われる． FeSO_4 処理の適期は，萌芽期～開花 4 日前となり，ボルドー液の適期と若干異なった．すなわち，開花後のボルドー液処理は着果を誘起したが， FeSO_4 の効果はなかったことから，着果を誘起する両イオンの作用機構は異なるのかもしれない．花器による Fe^{2+} と Cu^{2+} 吸収量が異なること，また，両イオンの花柱 RNase の抑制程度が異なることは，両

イオンの作用性の違いを示唆する.

2008～2013 年の 6 年間の調査において, 重金属イオンによる着果誘起効果には年次間差があることが明らかになった. この年次変化は, 開花期の環境条件に起因すると考えられる, すなわち, 着果率の低かった 2008 と 2012 年は開花期が多雨の年であり, 着果率の高かった 2009 と 2013 年は他年度より開花期が長い日照時間の年であった (気象庁 HP). このように, 栽培圃場でボルドー液を用いる場合は, 開花期の降雨・気温・日照等に配慮する必要がある.

ボルドー液処理は, 和合受粉花の着果に全く阻害作用を示さなかったことより, ボルドー液は人工受粉が十分できない時などの着果の補助剤としても使用可能と考えられる. 一方, ニホンナシにおいて GA_3 , GA_4 および CPPU を開花期の花に処理すると単為結果が誘起されるが (猪俣ら, 1993; Zhang ら, 2008), GA_4 は高価であるうえに奇形果を誘発することが多いため (Zhang ら, 2008), 実用的ではないと考えられる.

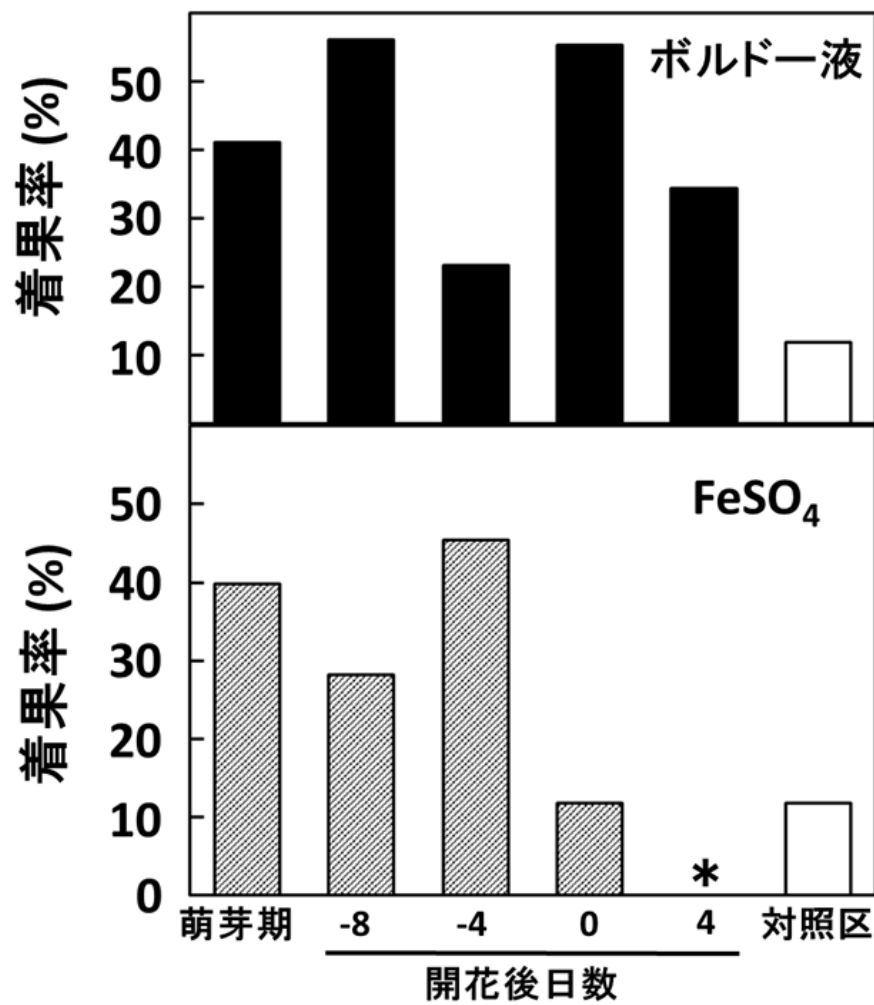


図 31. 異なった発育ステージの花へのボルドー液および FeSO₄ 処理が着果に及ぼす影響.

対照区は 0.1% Tween-20 処理

*未調査

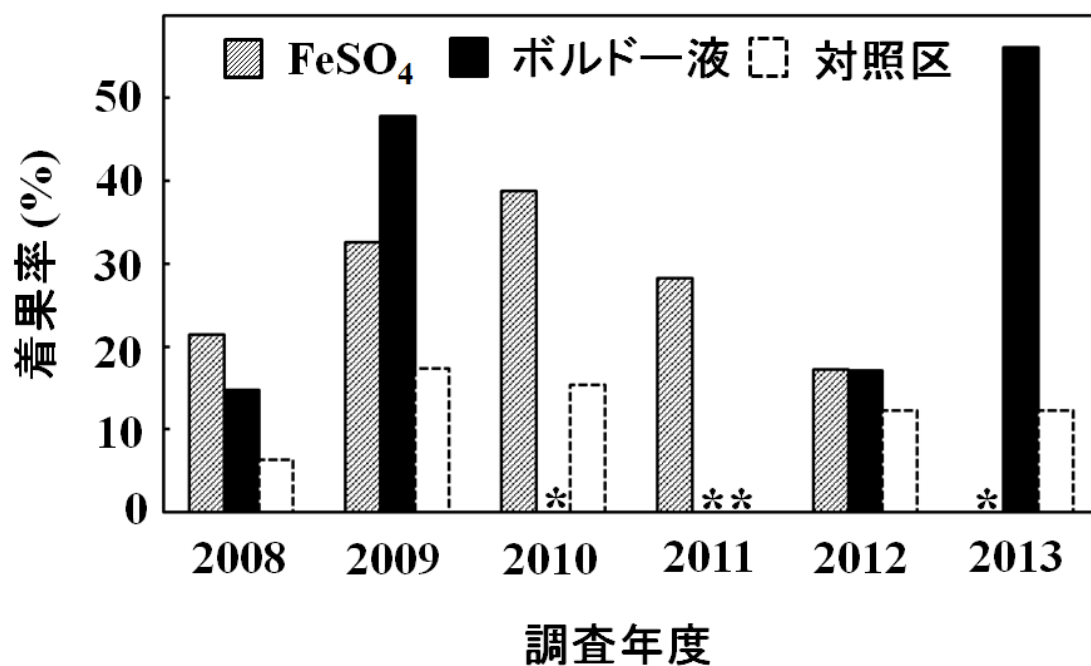


図 32. ボルドー液および FeSO₄ 処理による着果誘起率の年次変化.

対照区は 0.1% Tween-20 処理

*未調査

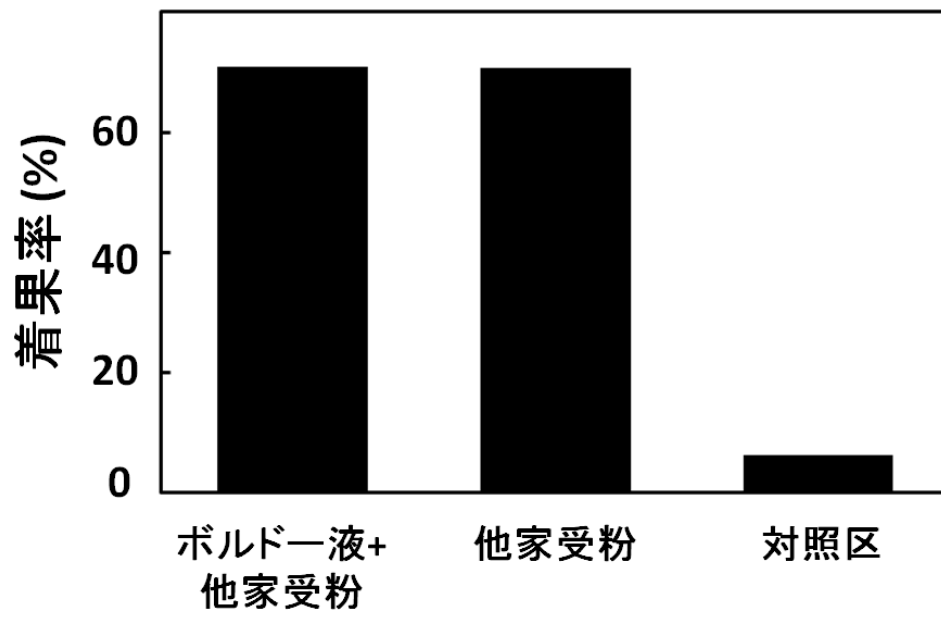


図 33. ボルドー液処理した花への他家受粉が着果率に及ぼす影響.

品種 = ‘幸水’

他家受粉用の花粉品種 = ‘長十郎’

対照区は 0.1% Tween-20 処理で無受粉

第二節 ボルドー誘起果の成育改善

前節で，開花前の‘幸水’へのボルドー液処理は着果を誘起することが判明したが，処理による着果効果が果そうによって均一でないこと，得られた果実の多くが小さい傾向にあることが問題点として挙げられた．また，短果枝と長果枝間で着果効果が異なる（私信）といわれているが，明らかではない．

そこで本節では，これらの問題点を解決することを目的に，枝による着果効果の違い，ボルドー液処理によって着果した果実（ボルドー誘起果）への植物ホルモン処理による成長改善や増収法について検討した．

材料および方法

植物材料

以下の実験 A, B および D には農場栽植の露地‘幸水’を，また，実験 C には三重県農業研究所のハウス栽培‘幸水’をそれぞれ 1 本ずつ供試した．

実験方法

A) 長果枝と短果枝における着果効果の違い

長果枝と短果枝をランダムに選び，処理する花そうの花の発育ステージを全て開花 8 日前に揃え，IC ボルドー 48Q を噴霧処理した．処理後，他家受粉を防ぐため袋掛けをし，開花 30 日後に着果率を調査した．実験には，それぞれ短果枝と長果枝の 10 花そうを用いた．

B) 1果そう当たりの着果数が果実品質に及ぼす影響

ボルドー液の着果効果が低い年の収量確保を目的に，1果そう当たりの着果数を増やした場合の品質を調査した．開花8日前の蕾にICボルドー48Qを噴霧処理して袋掛けし，開花30日後に葉果比25になるように1果そう当たり1(1果区)，2(2果区)および3果(3果区)に調整した．なお，2と3果区では周りの果実を摘果して葉果比25になるようにした．摘果時にはなるべく3～5番果を残すように心掛け，それぞれの果梗にGAペースト(GA)(協和発酵バイオ，東京)処理した．その後は慣行に従って栽培管理し，果皮表面色がニホンナシ‘幸水’用カラーチャートで3程度になった段階で収穫して果重を調査した．各区にそれぞれ12果以上を供試した．

C) ボルドー誘起果の果重および収穫期に及ぼすGAおよびGA+CPPU処理時期の影響

無加温ハウス‘幸水’において，ボルドー液で誘起された果実の果梗に対し，GAまたは100ppm CPPU(協和発酵バイオ，東京)を混和したGAを開花10, 21, 28, 35および49日後に塗布した．

対照区として，無処理果実を使用した．なお，全ての区において開花20日後に荒摘果，30日後に葉果比25となるよう仕上摘果した．また，他家受粉区として，‘長十郎’花粉で受粉して誘起した果実にGA処理した．果実の収穫は，果皮表面色がニホンナシ‘幸水’用カラーチャートで3程度になった段階で行い，果重および収穫期を記録した．各処理区において，それぞれ12果以上の果実を供試した．

D) 植物ホルモンの処理法がボルドー誘起果の果実成長に及ぼす影響

ボルドー誘起果を葉果比 25 に調整し, 下記の 4 種類の植物ホルモン処理法を行った.

- 1) CPPU 処理 : 15ppm CPPU をラノリンペーストに混和し, 開花 20 日後の果梗に塗布
- 2) GA 処理 : GA ペーストを開花 30 日後の果梗に塗布
- 3) CPPU solution+GA 処理 : 15ppm CPPU を開花 20 日後の果実に噴霧し, その 10 日後に GA ペーストを果梗に塗布
- 4) CPPU+GA paste: GA ペーストに 15ppm CPPU を混和し, 開花 30 日後の果梗に塗布

対照区として, 無処理果実を使用した. 果実の収穫は, 果皮表面色がニホンナシ‘幸水’用カラーチャートで 3 程度になった段階で行い, 果重を測定した. 各処理には, それぞれ 9 果以上の果実を供試した. なお, C および D の実験で CPPU の処理濃度が異なるのは, 明らかな効果を期待して 100ppm を用いて処理適期を検討したところ, 期待していた肥大効果が見られなかったため, メーカーの使用書に記載されている 15ppm に戻し処理法を模索した.

結果

長果枝と短果枝におけるボルドー液処理後の着果率は, それぞれ 29 と 32% だった (図 34). 短果枝の方が若干着果率が高い傾向を示したが, 両者に統計的な有意差はなかった. ま

た,1果そうに2および3果つけたボルドー誘起果の果重は,有意に軽かった(図35).

肥大促進のための植物ホルモンの効果的な処理時期を調査した結果,対照区の平均果重250gに対し,CPPU+GAは開花10および21日後,GAは開花28および35日後時期で果実を肥大させた(図36).特にCPPU+GAの開花10日後処理は肥大効果が顕著であり,全処理区の中で最も大きい平均430gを示した.処理時期が遅れると,CPPUの効果は減少傾向を示した.GAは開花後30日前後で最も効果的であり,その他の時期では効果は劣った.他家受粉果と同程度の果実は,CPPU+GAの開花10と21日後,GAの開花28日後処理で得られた.

開花20日後のCPPU,開花30日後のGAおよび開花30日後のCPPU+GA paste処理では,植物ホルモンの処理法を検討した結果,同様な肥大促進効果が見られた.また,15ppm CPPU溶液を20日後に噴霧処理し,30日後にGA処理した区の果重は,431gと最も大きかった(図37).興味深いことに,CPPU+GA paste区はCPPU solution+GA区より劣っていた.

処理区全ての熟期は,GA処理した他家受粉果より4~12日遅れた(図38).対照区と比較すると,GAは熟期を早めたが早い段階でのCPPU処理は,GAが混入されているにもかかわらず成熟の促進効果はなかった.

考察

ボルドー液による着果は短果枝の方が効果的と考えられて

いたが，本実験では長果枝との間に統計的な差は認められなかった．その要因として，他の試験場などでは処理適期を短果枝の花を中心に判断していたため，花の発育が遅い長果枝ではより未熟な蕾に処理していた可能性がある．本実験では，処理時に発育ステージの異なる蕾を除去してボルドー液処理を行っており，両者で着果率に違いは認められなかったことから，蕾の発育ステージが同じであれば着果効果に違いはないと考えられる．

これまで，開花前のボルドー液処理による着果は果そう間で不均一であり，1果も着果しない果そうが見られることも多く確認されている．このような場合，着果数の不足により収量の低下を招く可能性もある．そこで，1果そうに複数の果実をならせることが可能か調査した．しかし，1果そうに2個以上の果実を着生させると果実は小さくなり，さらに果実同士が接触して生育中に落果するものや接触部に虫害や腐敗が見られ，商品性のある果実を得ることは困難であった．これらのことから，1果そうに2個以上の果実を着生させるのは不適切と判断された．

ボルドー誘起果は250g前後の小さなものが多いため，果実成長の改善を試みた．一般に，ナシの果実はGAやサイトカイニンによって肥大促進されることから，ここではGAペーストと合成サイトカイニンであるCPPUの効果を検討した．処理したボルドー誘起果は，他家受粉果と同程度まで肥大したことから，これらは実用的に用いることが可能である．しかし，省力化を目的としてCPPUを混合したGAペーストを

開花 30 日後の果梗に処理したところ，CPPU による相加的な効果はなかった．さらに，開花 28 日以降の CPPU+GA 処理やそれ以前の GA 処理の効果も低かった．一般に，ナシの果実成長は 1) 開花後 2～4 週間の細胞分裂期，および，2) 開花 4 週間後から熟期までの細胞肥大期の 2 つのステージに分類される．CPPU は初期の細胞分裂を促進し，GA は後の細胞肥大を促進するとされている．従って果実肥大を目的とする場合，CPPU は細胞分裂期に，また，GA は細胞肥大初期に処理するのが望ましく，省力を目的とするには細胞肥大初期の GA ペースト処理が最適と考えられた．

‘幸水’は，収穫が早いほど単価が高く，農家にとって有益である．GA はボルドー誘起果の熟期を早めたが，GA 処理した他家受粉果より遅かった．これは，ボルドー誘起果の種子の多くが不完全種子のため，種子由来の内生ジベレリン含量が少ないからかもしれない．一方，CPPU は果実の肥大を促すが熟期の遅延化が見られると報告されている (Zhang et al., 2008)．本実験において，ボルドー誘起果への開花後 21 日以降の CPPU+GA 処理は特に熟期を遅延することにはなかったが，それ以前の処理では 1 週間程度の熟期の遅れが観察された．従って，熟期促進と果実肥大の両方を目的とする場合，開花後 30 日後の GA 処理が好ましいと考えられた．

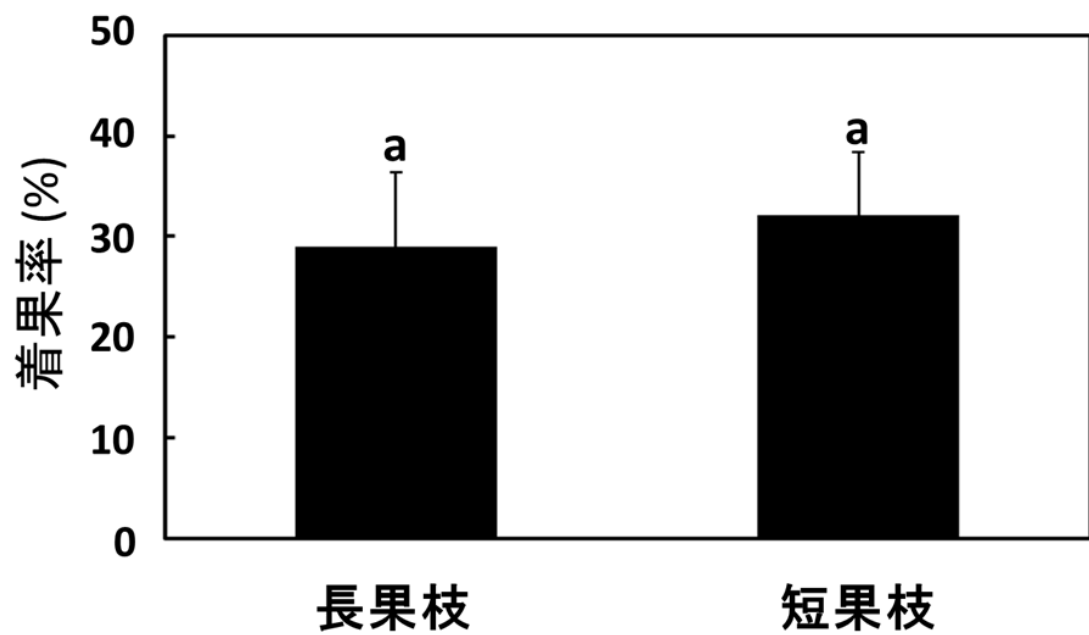


図 34. 長果枝と短果枝に着生した蕾へのボルドー液処理が着果率に及ぼす影響。

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Student の t 検定により 5% 水準で有意差があることを示す

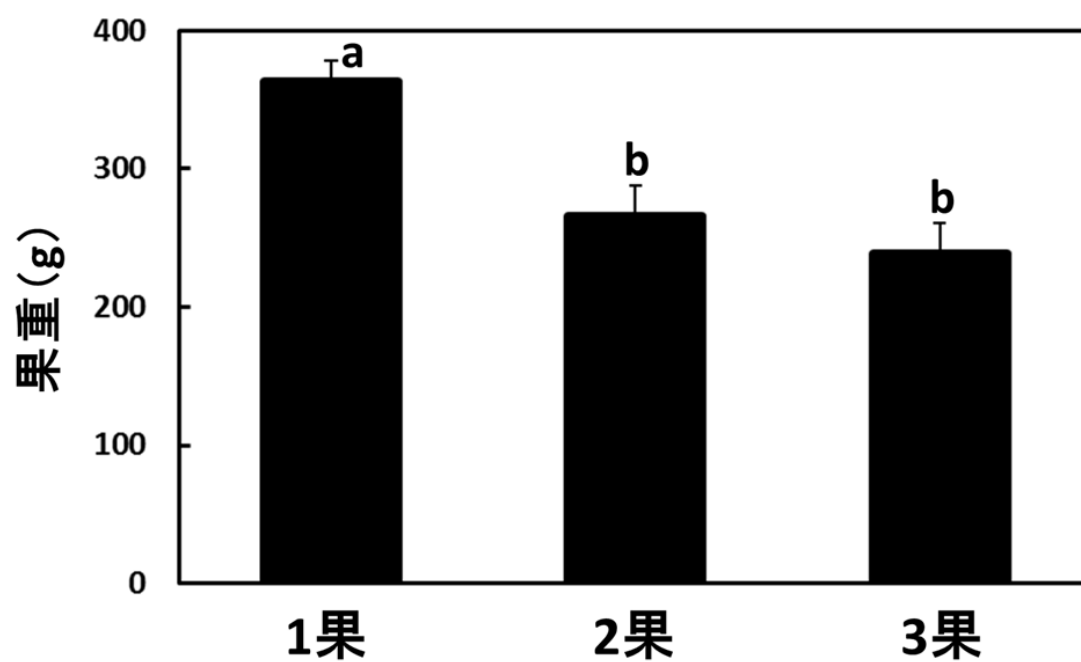


図 35. 1 果そう当たりのボルドー誘起果数が果重に及ぼす影響.

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

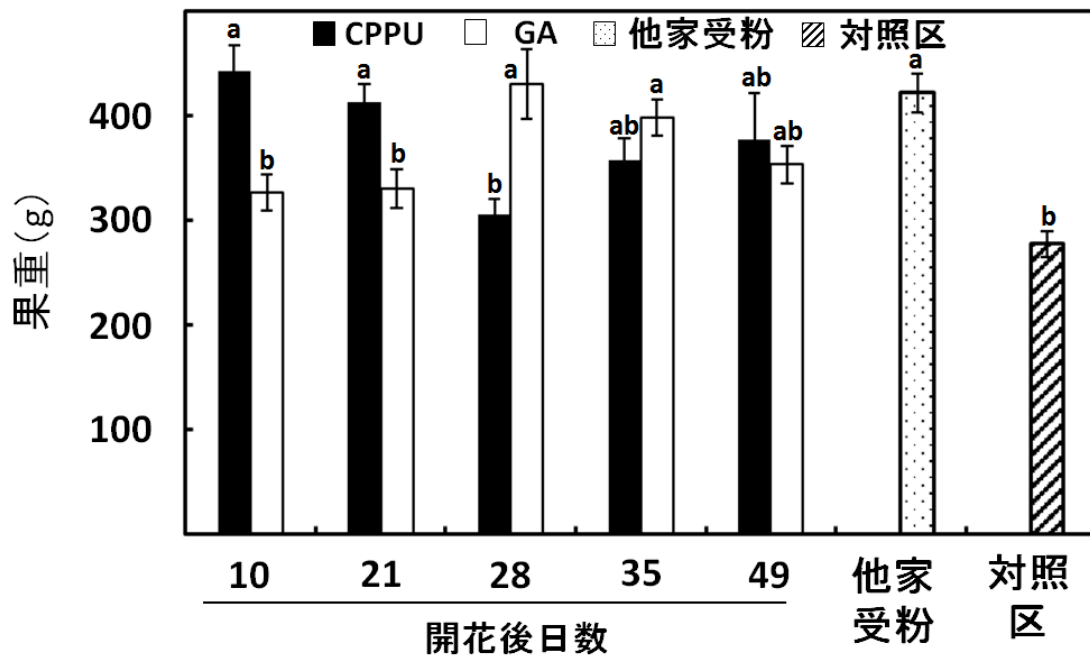


図 36. ボルドー誘起果の果重に及ぼす GA および

CPPU+GA 処理時期の影響.

GA : GA ペーストを処理

CPPU : 100ppm CPPU を混合した GA ペースト処理

他家受粉区 : 人工受粉して GA ペースト処理

対照区 : 無処理

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

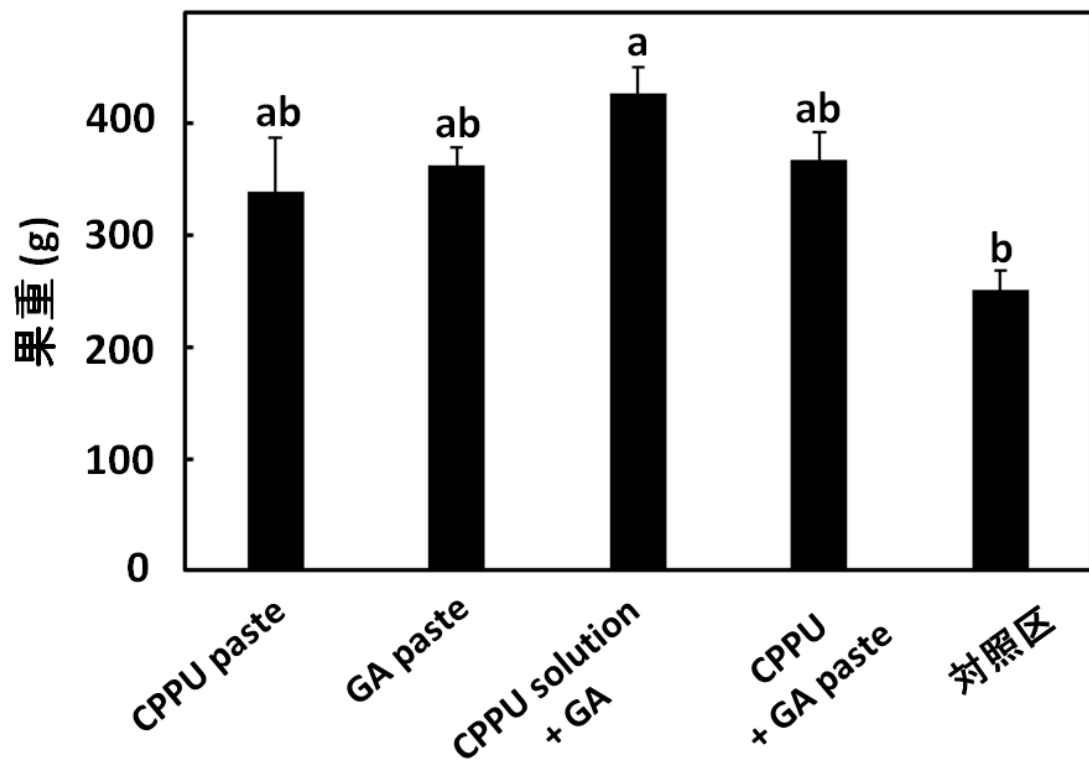


図 37. ボルドー誘起果の成長に及ぼす GA および CPPU 処理の影響.

CPPU : 15ppm CPPU をラノリンペーストに混和し開花 20 日後に処理

GA : GA ペーストを開花 30 日後に処理

CPPU solution+GA : 15ppm CPPU 溶液を開花 20 日後に処理し, その 10 日後に GA ペーストを処理

CPPU+GA paste : 15ppm CPPU を混和した GA ペーストを開花 30 日後に処理

対照区 : 無処理

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5%水準で有意差があることを示す

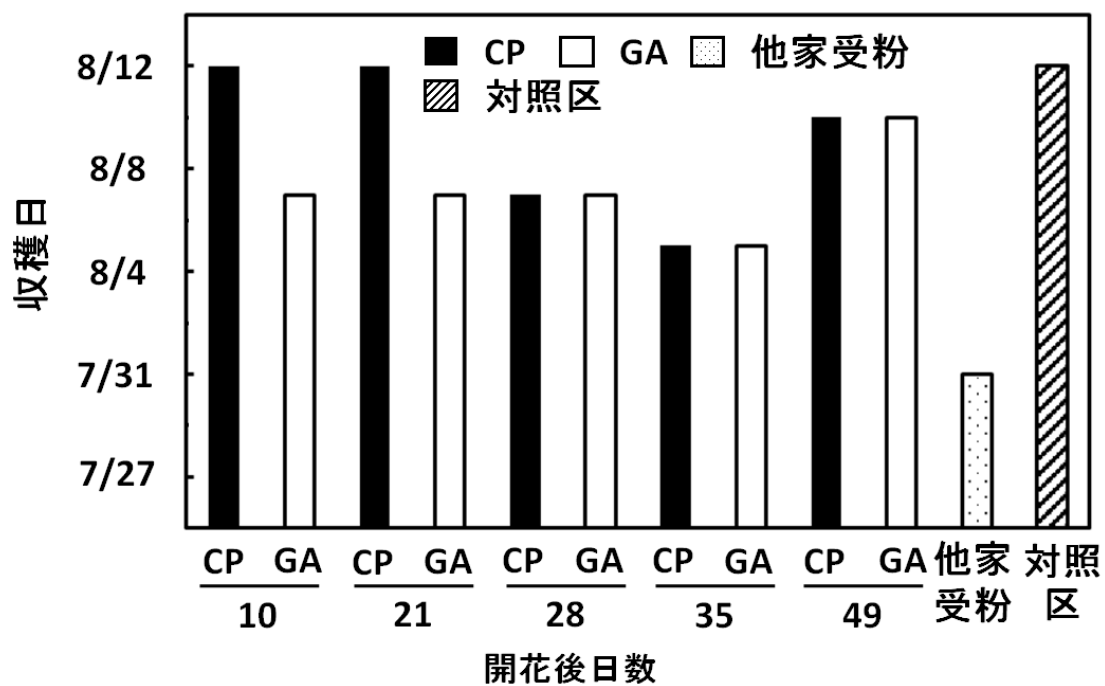


図 38. 無加温ハウスにおけるボルドー誘起果の収穫期に及ぼす GA および CPPU+GA 処理時期の影響.

GA : GA ペースト処理

CP : 100ppm CPPU を混合した GA ペースト処理

他家受粉区 : 人工受粉して GA 処理

対照区 : 無処理

第五章 ボルドー液による‘幸水’の省力着果管理栽培

第一節 露地栽培

Cu^{2+} を含む殺菌剤として、黒斑病や黒星病の防除に古くから使用されているボルドー殺菌剤があり、これは現在ナシのJAS法有機栽培に適合する薬剤として登録されている。開花前に散布される化学農薬の代わりにボルドー液を散布することにより、‘幸水’の単為結果を誘起し、また、その着果率は人工受粉よりも低かった。これらの結果から、無受粉で摘果作業を大幅に短縮した省力栽培ができる可能性がある。つまり、開花前の化学殺菌剤の代わりにボルドー液を用い、受粉が不要で、摘果作業も大幅に短縮化される栽培法であり、ここではこれを「ボルドー省力栽培法」と呼ぶ。なお、ボルドー誘起果の発育は悪かったが、GAペースト処理によって改善されることから、GAペースト処理も「ボルドー省力栽培法」における必須作業となる。

本節では、これまでの実験結果を踏まえ、栽培現場での実用化を想定したボルドー省力栽培法の実証試験を行い、その有用性と問題点を検証した。なお、同様に結実を誘起する FeSO_4 処理を比較実験として行い、ボルドー省力栽培法との違いを考察した。

材料および方法

植物材料

三重大学大学院生物資源学研究科附属紀伊・黒潮生命地域フィールドサイエンスセンター附帯施設農場栽植の成木‘幸

水’を1本供試した。

実験方法

－ボルドー省力栽培のほ場実証試験－

試験は2010および2011年の2年間行った。開花前の‘幸水’樹に、図39に示す昆虫の飛来を防ぐための不織布製網室(7m×6m、高さ約4m)を設置した。大半の蕾が開花8日前となった時期に、0.5樹(2本主枝樹の主枝1本分、樹冠占有面積は約21m²)にICボルドー48Q、残りの0.5樹に2mM FeSO₄溶液を噴霧処理した。開花30日後に、なるべく3～5番果を残すように仕上摘果を行い、果梗にGA処理した。なお、これらの処理に要した時間を測定した。慣行区として、試験樹の周りに栽植されているマルハナバチ放飼による受粉を行った樹を用い、GA処理は行わなかった。その後は慣行に従って栽培管理し、果実は果皮表面色がニホンナシ‘幸水’用カラーチャートで3程度になった段階で順次収穫して収穫日を記録した。また、収穫果実の果重、縦径、横径、種子数および糖度を記録した。なお、果実品質調査には両年とも80個以上を供試し、慣行区では平均的な果実を20果以上用いた。

結果

ボルドー液処理区における1果そう当たりの着果数は1～2果程度であり、軽く仕上げ摘果をすればよかった(図40)。一方、慣行区ではほとんどの果そうに4～5果が着生し、予備摘果と仕上げ摘果作業が必須であった。

2年にわたる実験での果実のサイズ別割合を図41に示した。可販果率（果重250g以上）は、慣行区では92（2010年）および73%（2011年）であった。一方、ボルドー区では89（2010年）および76%（2011年）、FeSO₄区では93（2010年）および66%（2011年）となり、慣行区との大きな違いは見られなかった。2010年には、果重、縦径および横径に処理間で有意な差は認められなかったが、2011年はFeSO₄区で果重が慣行区よりも有意に小さかった（表1）。種子について見ると、ボルドー区とFeSO₄区で完全種子が極めて少なかった。糖度は、2010年には慣行区で有意に高かったが、2011年は処理間に有意な差は認められなかった。

ボルドー区では収穫期が早まり、実験地の三重県で8月中旬までに52（2010年）～65%（2011年）の果実を、また両年とも8月下旬にはすべての果実が収穫できた（図42）。一方、FeSO₄区では、8月中旬までに50（2010年）～72%（2011年）の果実を、また、両年とも8月下旬までにはすべての果実が収穫できた。慣行区では、8月中旬までに15（2011年）～19%（2010年）しか収穫できず、両年とも9月上旬まで収穫できないものもあった。

2010および2011年の1m²当たり（および樹冠占有面積率の0.85を乗じた10a当たり）の収量はそれぞれ、FeSO₄区で1.4（1,190）および2.6kg（2,210kg）、ボルドー区では1.3（1,105）および2.4kg（2,040kg）となった（表2）。これに対し、慣行区ではそれぞれ1.2（1,020）および1.4kg（1,190kg）となった。なお、本試験を行った果樹園栽植の‘幸水’は40

年生以上の古木であり，全体的に収量は低い傾向にあった．

ボルドー液および FeSO_4 溶液処理に要した時間（10a 当たり）は，2010 年はそれぞれ 6.6 および 5.0 時間，2011 年は 3.8 および 4.5 時間であった（図 43）．また，摘果と GA 処理に要した時間は，2010 年はボルドー区が 13.5 時間， FeSO_4 区が 11.6 時間，2011 年には両区とも 20.3 時間であった．

考察

ボルドー液処理で誘起された果実は，果重が 250g 前後になることが多い．そこで，果実肥大に効果のある GA ペースト（安延，1981）を処理したところ，慣行区と同程度の果実を得ることができた．このように，ボルドー液処理によって誘起した果実を可販果とするためには GA 処理が必須である．また，2011 年の FeSO_4 区の果重は慣行区よりも小さかったが，2010 年および 2011 年ともにボルドー区と同程度であったことから， FeSO_4 で誘起された果実とボルドー液で誘起された果実との間に，GA に対する反応の違いはないと考えられる．

ニホンナシ果実への GA 処理は熟期を促進する（Zhang et al., 2005）．ボルドー液や FeSO_4 処理により誘起された果実に GA 処理したところ，GA 処理しなかった慣行区より大幅に収穫時期が早まり，8 月中旬までに収穫できた果実の割合は約 2.5～4.5 倍高かった．このことから，GA 処理は単為結果果実の成熟を促進し，また，熟期促進に対する GA の影響には，ボルドー液と FeSO_4 で誘起された果実の間で差はないと

考えられる。

ボルドーと FeSO_4 区の果実収量には大きな差は見られなかったが、両者とも慣行区より高い傾向にあった。しかし、一般的な‘幸水’の収量目標は 10a 当たり 3t となっており（大友，2005），本実験における収量は，その 1/3～2/3 程度であった。他の果樹園での実証試験も必要であるが，実用化のためには着果数を増やす技術の開発が必要かもしれない。2010 年のボルドーと FeSO_4 区における果実収量は，2011 年に比べて低かった。これは，2010 年は着果数が少なかったことが原因であるが，この年は全国的に開花期の降雨や低温による結実率の低下が見られたことから（農林水産省 HP／果樹生産出荷統計），ボルドー液の効果は開花期の気象条件に影響されるものと推察された。今後，気象条件と着果促進効果との関係を明らかにするとともに，不適切な気象条件下における効率的な処理法についての検討が必要である。一方，慣行区での収量が両年で変わらなかったのは，当果樹園では例年 10a 当たり 1t という低い収量を目標としており，結実率が低下しても目標値達成には影響しなかったためと考ええる。

着果を誘起するための薬剤処理に要した時間は，10a 当たりボルドーが 3.8（2011 年）～6.6 時間（2010 年）， FeSO_4 が 4.5（2011 年）～5 時間（2010 年）であった。一方，慣行栽培での人工受粉には 9 時間必要である（築取，1991）。ボルドー液は黒斑病や黒星病の防除を目的に，ニホンナシの開花前に散布することのできる殺菌剤であり，近年，従来の化学農薬に耐性をもつ黒星病菌が多発している地域もあるため，

ボルドー液による防除法が再検討されている（私信）．このように，現状のニホンナシ栽培でのボルドー液利用には前向きな動きがあり，開花前に用いられている慣行の殺菌剤の代わりにボルドー液を散布すれば，散布のための作業時間は不要である．さらに，受粉作業やそれに伴う経費も削減できる．一方， FeSO_4 は殺菌剤としての作用もなく，着果誘起効果もボルドー液とほとんど変わらないことから，着果させるための薬剤としてはボルドー液のほうが現実的である．

ボルドー液で着果させた果実を十分に肥大させるためには，GA 処理が必要であった．そこで，摘果と GA 処理に要する時間を調査したところ，10a 当たり 13.5（2010 年）～20.3 時間（2011 年）であり，一方，人工受粉を行う慣行栽培での摘果時間は 66.7 時間（多比良ら，1999）である．同一ほ場から得たデータではないため単純な比較はできないが，本栽培法での摘果時間は，GA 処理に要する時間を含めても慣行栽培の 1/5～1/3 程度となり，大幅な省力化が図れるものである．摘果は，季節的制限を伴う手作業であるため，労働生産性の向上や経営規模拡大の大きな制限要因となっており，摘果作業を省力できる意義は大きい．

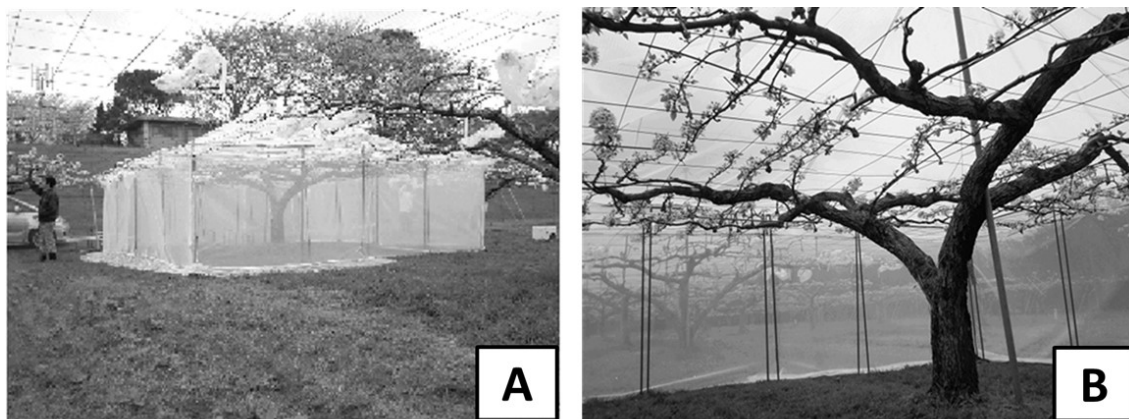


図 39. 不織布で作成した網室の様子.

A : 外観 (縦 7m × 横 6m × 高さ 4m)

B : 室内



図 40. マルハナバチ放飼による慣行区（A）と
ボルドー区（B）における着果の様子。

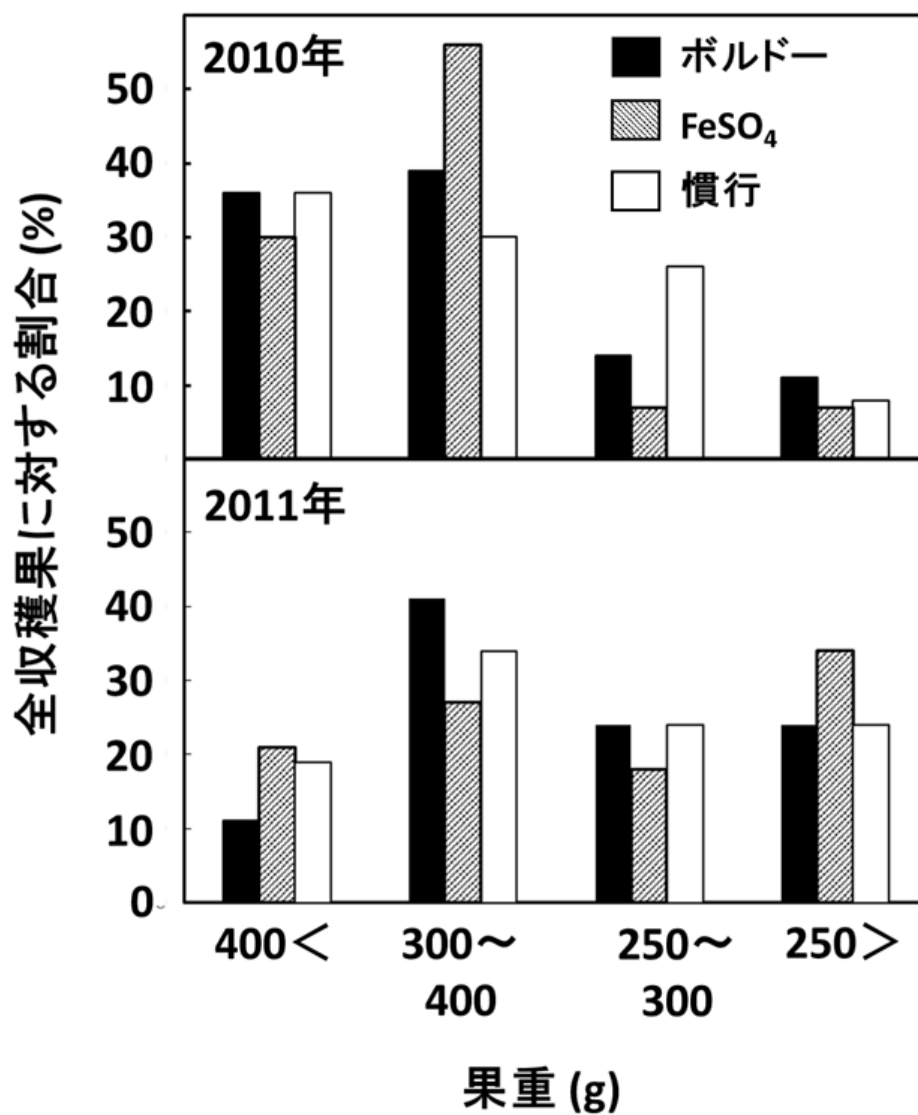


図 41. ボルドー，FeSO₄および慣行区における収穫果の果重の分布率．

表 1. 実証試験におけるボルドー，FeSO₄および他家受粉区における果実品質の比較.

試験年度	処理区	果重(g)	縦径(cm)	横径(cm)	完全種子数/果	不完全種子数/果	糖度(°Brix)
2010年	FeSO ₄	347±18.5a ^z	7.6±0.1a	8.9±0.2a	0.3±0.1a	10.3±0.4a	12.0±0.2b
	ボルドー	324±12.8a	7.3±0.1a	8.7±0.1a	0.3±0.1a	11.0±0.3a	12.2±0.1b
	慣行	358±7.8a	7.3±0.1a	9.2±0.1a	^y	^y	13.1±0.1a
2011年	FeSO ₄	280±9.6b	7.0±0.1a	8.1±0.1b	0.2±0.1a	9.4±0.5a	12.6±0.1a
	ボルドー	309±7.7ab	7.2±0.1a	8.7±0.1a	0.4±0.1a	9.4±0.4a	12.5±0.1a
	慣行	360±8.6a	7.3±0.1a	9.4±0.1a	^y	^y	12.3±0.1a

開花 30 日後に仕上摘果と果梗への GA 処理を行った

^z 平均値 ± 標準誤差

^y 未調査

異なるアルファベット間には，Tukey-Kramer の多重検定により

5%水準で有意差あり

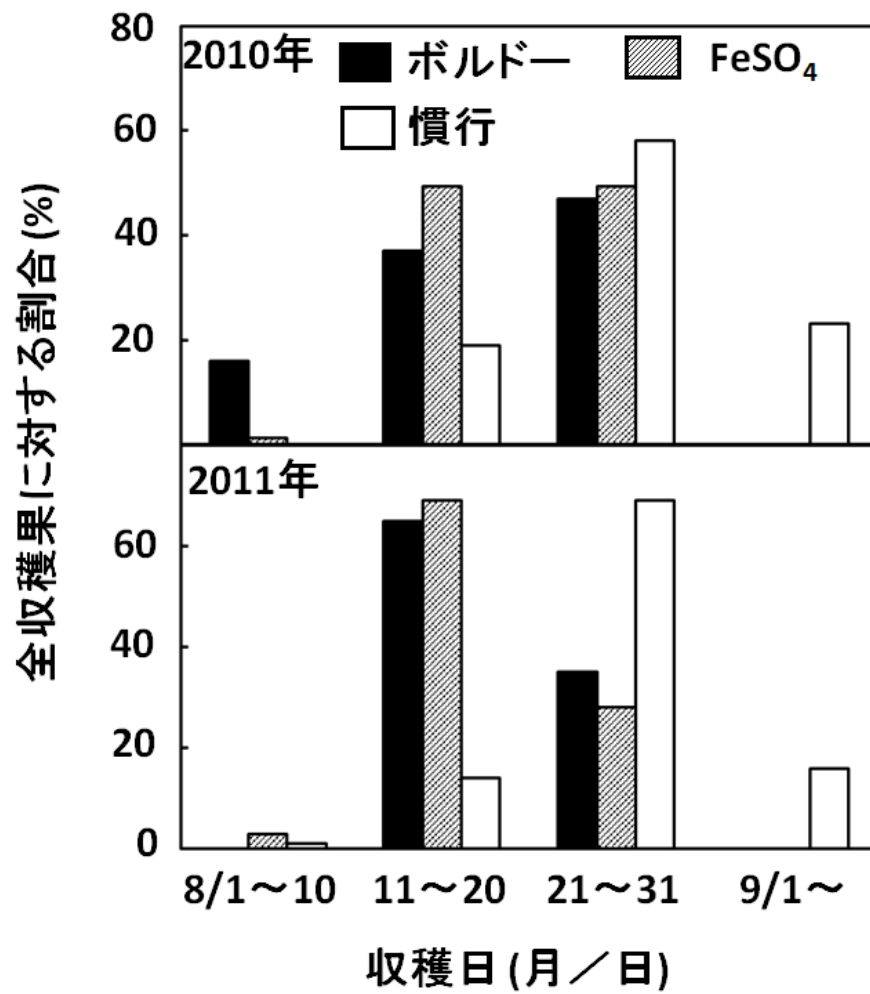


図 42. ボルドー，FeSO₄および慣行区における果実の収穫日の分布．

表 2. 実証試験におけるボルドー，FeSO₄ および

他家受粉区の収量の比較.

試験年度	処理区	1 m ² 当たりの収量(kg)	10 a当たり換算収量(kg) ^y
2010	ボルドー	1.3	1105
	FeSO ₄	1.4	1190
	慣行 ^z	1.2	1020
2011	ボルドー	2.4	2040
	FeSO ₄	2.6	2210
	慣行 ^z	1.4	1190

開花 30 日後に仕上摘果と果梗への GA 処理を行った

^z 同果樹園内のマルハナバチ放飼による慣行栽培‘幸水’58 樹における平均データ．GA 処理なし

^y 樹冠占有面積率 0.85 を乗じた 10 a 当たりの収量

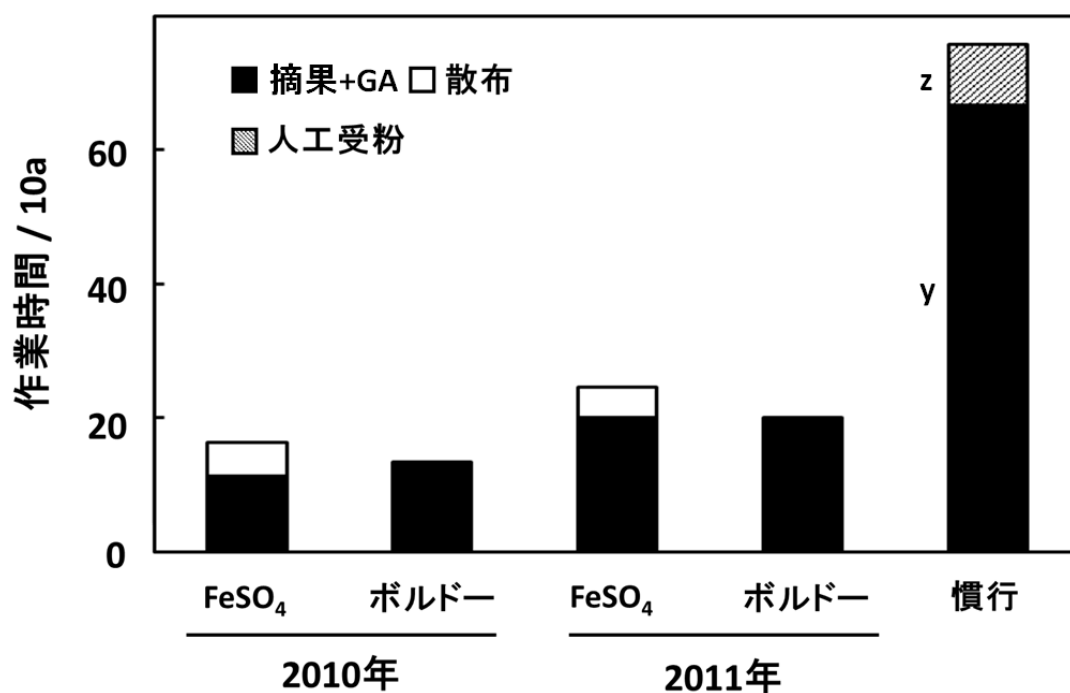


図 43. 薬剤散布，摘果および GA 処理する作業時間の比較．

各値は，0.5 樹当たりの実測作業時間を 10a 当たりに換算し，それに樹冠占有面積率 0.85 を乗じた値

ボルドー液は開花前の殺菌剤処理であるため，作業時間は 0 とした

z 人工受粉時間は築取（1991）より引用

y 摘果作業時間は多比良ら（1999）より引用

第二節 加温・無加温ハウス栽培

‘幸水’のハウス栽培は盛んに行われており、その目的は、収穫期間の拡大、成熟の促進、高品質果実の生産である。ハウス栽培では燃料や資材費がかかるため、安定的な着果を確保するために人工受粉を行って、果実肥大や成熟促進を目的とした GA 処理を行い、収益増加を図っている。このように、露地栽培よりも経費のかかるハウス栽培では、徹底した栽培管理やハウス内の環境管理が必要となり、労力が大幅に増大する。一方、‘幸水’における施設栽培の問題点として、縦長果になりやすく、こうあ部が発達しない洋ナシ型の果実や有てい果などの変形果が多く発生することが知られている（渡邊ら，2003）。

前節で、露地栽培‘幸水’へのボルドー省力栽培法の適用は、大幅な作業の省力化や果実の熟期促進を可能にすることを実証した。本節では、ハウス栽培‘幸水’へのボルドー省力栽培を実施し、露地栽培と同様な作業の省力化が可能かについて検討し、併せて果実品質に及ぼす影響を調査した。

材料および方法

植物材料とハウス温度条件

三重県農業研究所の加温と無加温ハウス栽培‘幸水’樹を、それぞれ 4 本ずつ使用した。ハウスのビニール展張は、2012 年の 1/21～24 にかけて行い、加温ハウスでは、2/18 に設定温度を 10℃として加温を開始した（表 3）。また、開花期（3/16）に 15℃設定とし、開花後 40 日から再び 10℃とした。無加温ハウスの被覆は 2/20 に行った。なお、加温および無加温ハウ

スにおけるボルドー処理樹の開花最盛期は 3/16 および 3/28 であり，開花終期はそれぞれ 3/24 と 4/1 であった．

実験方法

ーボルドー液散布，人工受粉および摘果作業時間ー

両ハウスとも，大半の蕾が開花 8 日前と判断された時期に，IC ボルドー 48Q を噴霧処理した．なお，加温・無加温のボルドー液処理および対照区にそれぞれ 2 樹（樹冠占有面積は約 28m²）を用いた．他家受粉を防ぐため，処理樹をビニールフィルムで仕切り，人工受粉している他樹と隔離した．開花 30 日後に，なるべく 3～5 番果を残すように仕上摘果を行い，果梗に GA 処理した．慣行区では，梵天を用いて 2 回人工受粉し，開花 20 日後に荒摘果，開花 30 日後には仕上摘果をして果梗へ GA 処理した．ボルドー区で仕上摘果のみとしたのは，露地の場合と同様に着果率が他家受粉区より低く，また，省力化を図りたかったからである．なお，加温ハウスにおいて，1,000 花そう当たりのボルドー液散布，人工受粉ならびに摘果に要する時間を測定した．

ーボルドー誘起果の初期果実肥大ー

加温および無加温ハウスにおいて，開花 30 日後から 90 日後まで 10 日ごとに果実の横径を測定し，初期果実肥大を調査した．両ハウスともボルドー区に 15 果，慣行区に 30 果を供試した．

ーボルドー誘起果の成熟期および果実品質ー

果皮表面色がニホンナシ‘幸水’用カラーチャートで3程度になった段階で収穫し，収穫量の最も多い日を収穫最盛期とした．また，最盛期の平均的サイズの果実の果重，縦径，横径，完全種子数および糖度を測定した．加温・ボルドー区には27果，慣行区に16果，無加温・ボルドー区に20果および慣行区に16果を供試した．

－障害果の発生－

全ての収穫果を，正常果，虫害果（カイガラ，ハマキ，シンクイおよびカメムシ），病害果（輪紋，赤星および黒星病），生理障害果（芯腐れ，裂果，日焼け，傷および汚れ），発育不良果に分類し，ボルドー栽培法における果実品質の問題点を抽出した．

結果

1,000花そう当たりのボルドー液散布作業時間は15分であり，人工受粉作業時間のわずか1/4であった（図44）．一方，ボルドーと慣行区の摘果作業時間は63および128分であり，摘果作業の省力性は露地よりも低かった．これは，ハウス‘幸水’は露地栽培よりもボルドー液による着果誘起効果が高かったことによる（図45）．

加温ハウスにおいて，開花30日後の果実の横径はボルドー区で16.9，慣行区では23.9mmとなり，ボルドー区は有意に小さかった（図46）．両区とも，日数が経過するにつれ横径は徐々に大きくなり，その差は広がった．開花90日後にはボルドー区で66.8mm，慣行区で76.9mmだった．無加温ハウ

スでも同様の傾向を示し、ボルドーと慣行区の果実の横径は、開花 30 日後で 16.8 および 21.2mm, 90 日後では 65.1 および 73.9mm となり、慣行区より有意に小さかった。

加温ハウスにおいて、収穫最盛期の果重はボルドー区で 387g, 慣行区で 429g となり、両者に有意な差は見られなかった(表 4)。また、ボルドー区の完全種子数は 0.1 個/果と有意に少なく、ほとんどが不完全種子だった。ボルドー区の収穫開始時期は慣行区より 3 日遅れ、収穫最盛期は 6 日遅れた。一方、無加温のボルドー区の果重は 337g であり、慣行区と比較して有意に小さく、横径も有意に小さかった。また、ボルドー区の種子のほとんどは不完全種子だった。無加温では両区とも 7/26 に収穫が始まり、ボルドー区の収穫最盛期は慣行区より 5 日遅れた。

加温と無加温ハウスのボルドー区の発育不良果の割合は、慣行区の 0%と 1%に対し、ともに 6%と高かった(表 5)。また、無加温ボルドー区の虫害果割合は 6%と高く、加温ボルドー区では慣行区との大きな違いは見られなかった。

考察

前章において、露地「幸水」へのボルドー液散布は受粉作業を不要とし、摘果作業時間を短縮した。本節で、ハウス「幸水」の 1,000 花そう当たりのボルドー液散布時間は受粉作業時間の 1/4 であり、露地「幸水」と同様の省力効果が得られた。しかし、ハウス内でのボルドー液散布は、ハウスのフィルムを汚すことが懸念され、処理方法などの工夫や注意が必

要であり、処理後にフィルムを洗浄する等の作業が必要となるかもしれない。

加温ハウスのボルドー区の摘果作業時間は、慣行区より短縮された。しかし、着果数などが異なるため単純には比べられないが、露地より作業短縮率は低かった。これは、ハウス‘幸水’での着果率が高かったためである。前章で開花期の雨や低温が着果効果を低下させることが確認されていることから、ボルドー処理樹が風雨に晒されないことや開花期の高温により効果が高まった可能性がある。従って、適度な着果を誘起するようなハウス‘幸水’用のボルドー液処理適期を見い出す必要がある。

両ハウスのボルドー区の果実は、開花 30 日後から慣行区より有意に小さかった。これは、ボルドー誘起果の種子の多くが不完全種子のため、果実肥大に必須な種子由来の内生ジベレリン含量が少ないからかもしれない (Zhang et al., 2007)。また、ボルドー液による着果誘起効果が露地‘幸水’より高かったにもかかわらず、本実験では仕上摘果のみを行った。この着果負担が、荒摘果作業の時期に当たる果肉細胞の分裂を抑制し、果実肥大が抑えられた可能性もある。一方、加温ハウスの収穫最盛期のボルドー果実重は、慣行区と差がなかったのに対し、無加温では有意に小さかった。これは、加温ボルドー区の着果効果が果そうによって均一でなく、着果数が 150 個前後だったのに対し、無加温ボルドーおよび慣行区では 200～250 個ほどであったことが原因と考えられる。他の果樹園での実証試験も必要であるが、前述したように適度

な着果を誘起するハウス‘幸水’用のボルドー処理適期を見い出すことにより，少なくともこれらの問題の一部は解決可能と考えられた．

露地において，ボルドー誘起果への GA 処理は収穫期を早めたが，ハウスでの収穫最盛期は，慣行区より 5-6 日遅かった．ハウス栽培では慣行区も GA 処理していることが原因である．また，慣行区では 2 回の人工受粉で果実内に多くの種子が形成されていることから，種子由来の内生 GA が成熟を促進した可能性もある．

無加温ハウスのボルドー区の収量は慣行区と同じだったが，加温ボルドー区の果実は大きかったにもかかわらず，収量は低かった．これは，上述したように加温ハウスでの着果数が少なかったためである．一方，両ハウスにおけるボルドー区の発育不良果は，慣行区と比較して多かった．これは，上述したように種子のほとんどが不完全種子のため，種子由来の内生ジベレリン含量が少ないことが原因と考えられる．また，無加温ボルドー区の虫害および生理障害果は慣行区より若干多かった．しかしながら，無加温ボルドー区の 1 樹の方からでしか高い割合の虫害果を得ていないため，供試した樹に問題があったと思われる．

ハウス栽培‘幸水’でのボルドー省力栽培は，受粉作業が不要であるが，処理する際にハウスのフィルムを汚す懸念があり，処理方法の工夫や注意が必要である．また，ハウスのボルドー誘起果は，慣行栽培用の果実数を着生させると肥大が抑制されたが，その果実は約 340g と大きく，ハウス栽培

‘幸水’として販売可能である．従って，果実サイズや熟期について課題は残るものの，ハウス‘幸水’栽培におけるポルドー栽培法は労力軽減に大きく貢献することが考えられる．

表 3. 加温・無加温ハウスの温度管理と開花.

ハウス	処理区	被覆	設定温度(日付)			開花期		
			加温	開花頃	開花後40日～	始	盛	終
加温	ポルドー 慣行	-	10℃(2/13)	15℃(3/16)	10℃(4/25)	3/15	3/16	3/24
						3/15	3/17	3/21
無加温	ポルドー 慣行	2/20	-	-	-	3/26	3/28	4/1
						3/25	3/27	4/1

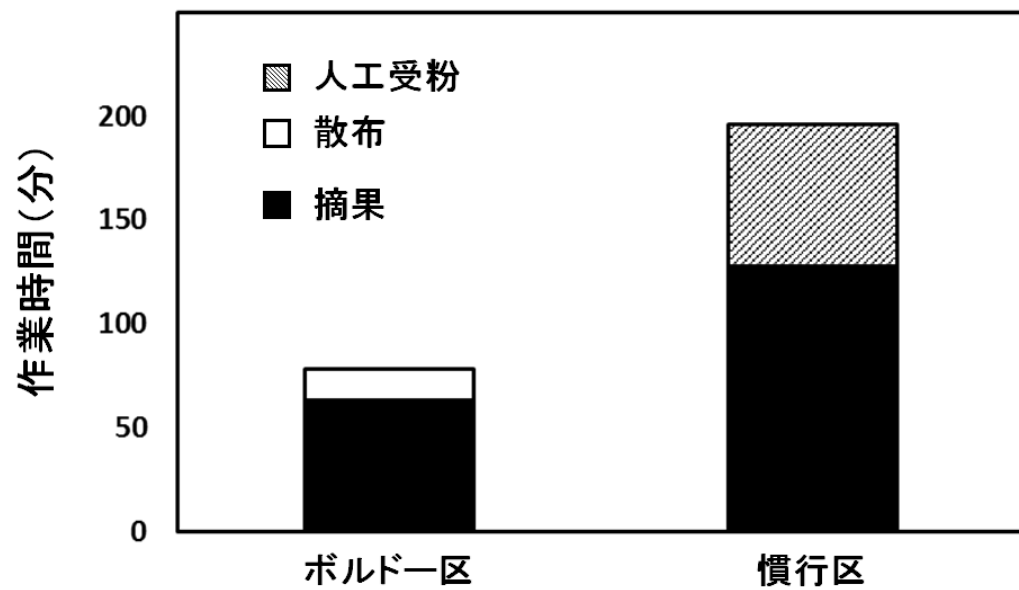


図 44. ボルドー液散布，人工受粉および摘果作業時間．

1,000 花そう当たりの作業時間

人工受粉は梵天を用いて 2 回行った

ボルドー区は開花 30 日後に仕上摘果を行った

慣行区は開花 20 日後に荒摘果および開花 30 日後に仕上摘果を行った

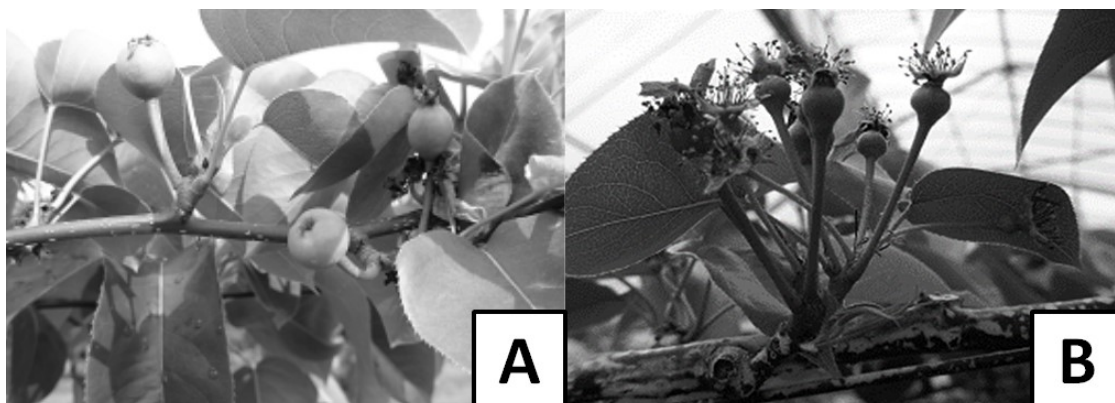


図 45. 露地 (A) およびハウス栽培 ‘幸水’ (B)におけるボ
ルドー液処理により着果誘起した果そう。

ハウスの方がボルドー液による着果促進効果が高い

開花 30 日後の様子

ボルドー液は開花 8 日前に処理

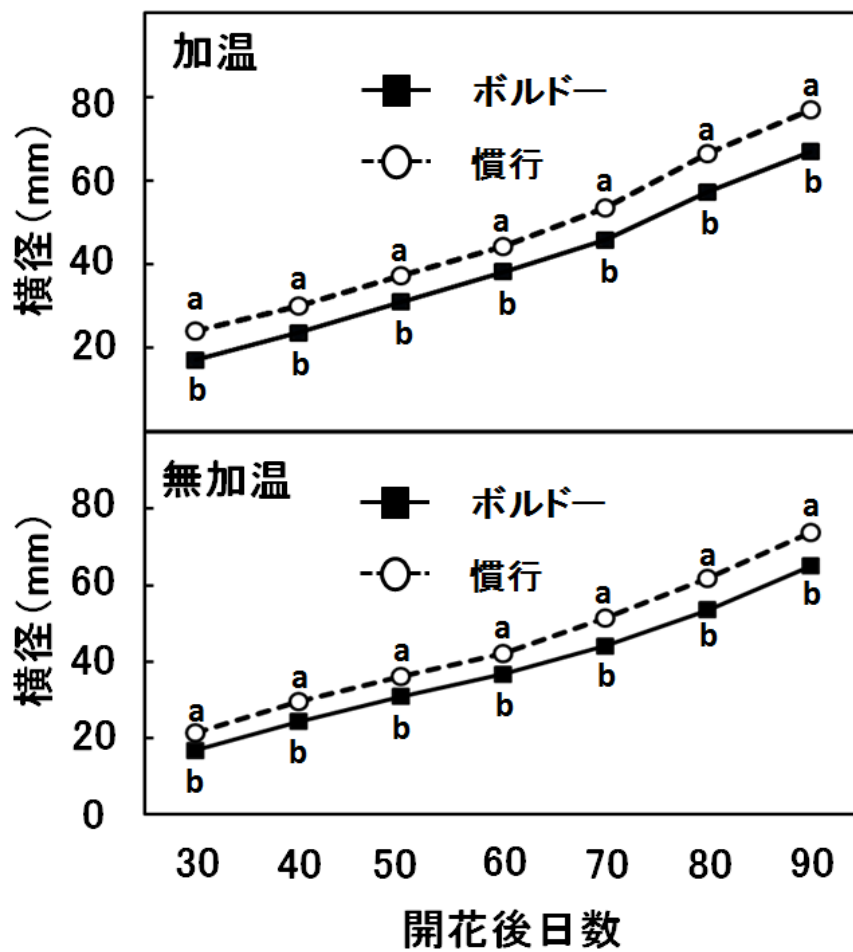


図 46. 加温・無加温ハウスにおけるボルドー誘起果と他家受粉誘起果の成長。

両区とも GA 処理は開花 30 日後に行った

縦線は標準誤差を示す

異なるアルファベット間には, Tukey-Kramer の多重検定により 5% 水準で有意差があることを示す

表 4. ハウス栽培におけるボルドーおよび慣行区の果実品質と収穫期.

処理区		果重(g)	縦径(cm)	横径(cm)	縦/横	完全種子数/果	糖度(°Brix)	収穫開始	収穫最盛期	収穫終期
加温	ボルドー	387±11.1a ^z	7.6±0.1a	9.4±0.1a	0.81a	0.1±0.1b	12.3±0.2a	7/12	7/23	8/2
	慣行区	429±17.2a	7.9±0.1a	9.8±0.2a	0.81a	4.3±0.7a	11.6±0.3a	7/9	7/17	7/30
無加温	ボルドー	337±7.0b	7.6±0.1a	9.0±0.1b	0.84a	0.1±0.1b	11.9±0.2a	7/26	8/4	8/16
	慣行区	419±8.0a	8.0±0.1a	9.6±0.1a	0.83a	6.3±0.4a	12.4±0.2a	7/26	7/30	8/9

収穫最盛期の平均的サイズの果実を調査

^z 平均値±標準誤差

各ハウス内における異なるアルファベット間には, Student の t 検定により 5%水準で有意差あり

表 5. ハウス栽培におけるボルドーおよび慣行区の障害果率.

ハウス	処理区	障害果の個数 (%)			
		虫 害 ^z	病害 ^y	生理障害 ^x	发育不良
加温	ボルドー	3	0	2	6
	慣行	1	0	3	0
無加温	ボルドー	6	0	10	6
	慣行	0	0	7	1

収穫期の果実を調査

^z 夜蛾, カイガラ, ハマキ, シンクイおよびカメムシ

^y 輪紋, 赤星および黒星病

^x 芯腐れ, 裂果, 日焼け, 傷, 汚れ, 落果およびみつ症

第六章 総合考察

本研究は，ニホンナシへの重金属イオン散布による着果誘起効果を明らかにし，その栽培への利用を圃場レベルで確認したものである．これらの結果は，‘幸水’の新しい省力栽培法の確立・普及の基礎情報となるとともに，ニホンナシの着果や単為結果についての重要な生理学的知見になるものと考えられる．

ニホンナシの花は，同一品種の花粉では受精・着果しない自家不和合性を有し，この性質は不和合性遺伝子（S 遺伝子）によって支配されている．雌ずい側の S 遺伝子産物は RNA 分解酵素（*S-RNase*）であり，不和合反応にはその RNase 活性が必要である（Hiratsuka et al., 2001; Huang et al., 1994; Kowiyama et al., 1994; McCubbin et al., 1997; Royo et al., 1994）．果実生産において不和合性は大きな障害となっており，この問題に対処する 1 つの方法として他品種樹の混植が行われている．しかし近年，農作物への農薬散布を規制して安全な食料生産を目指すポジティブリスト制度が導入され（厚生労働省 HP），栽培管理法，特に収穫時期の異なる品種どうしの混植は好ましくない．さらに，ニホンナシは虫媒花であり，花粉を媒介する昆虫は農薬の多用によって激減しているといわれており，また，昆虫の活動は低温などの気候要因により影響されるので，十分な着果を期待できない場合が多い（米山，1991）．そのため，主要なニホンナシ産地では人工受粉が行われているが，果実生産に必要な幼果は咲いた花の約 5%であることから（平塚ら，2002），着果させたにもかかわらず余分な果実を摘果している．これらの作業は，季節

的制約を伴ううえ熟練を要する手作業で，全労働時間の 1/4 以上を占めるため，労働生産性の向上や経営規模拡大の大きな制限要因となっている．*S₄-RNase* 遺伝子が欠損した自家和合性品種である‘おさ二十世紀’を用いた自家和合性品種の育成が進められているが，完全和合性品種では摘果に膨大な時間を要するため，これにも問題が残る．従って，効率的に着果・摘果させるための 1 つの方法として，自家摘果性品種（適度に着果する品種）の育成や適切な摘果剤の開発が求められている．本研究は，以上の背景を踏まえて遂行されたものである．

近年， ZnSO_4 や CuSO_4 が *Lycopersicon peruvianum* の S-RNase 活性を抑制することが報告された（Kim et al., 2001）．また，野生種トマトやリンゴなどの自家不和合性打破が可能とされる“apple+”が開発されたが（Chung et al., 2005），この薬剤のニホンナシに対する実用的な効果は低かった．すなわち，適度な着果促進効果を示すものの，果実の発育は極めて悪かった（平塚ら，2009）．そこで，ニホンナシに適した金属塩を探す目的で，ナシの花柱 RNase 活性を抑制する金属塩を探索し，それらが着果誘起するか否かを検討した．花柱タンパク質の RNase 活性は CuSO_4 や ZnSO_4 によって抑制され， FeSO_4 でも若干の抑制効果が見られるとともに，これら全ての重金属塩は同様に‘幸水’の着果を誘起した．当初，重金属塩は S-RNase 活性を抑制し，その結果不和合性を打破して着果させていると考えた．しかし，重金属塩は自家花粉管伸長を促進せず，得られた果実内の種子のほと

んどが不完全種子であったことから，重金属塩は単為結果を誘起すると結論付けた． CuSO_4 処理による着果誘起が Cu^{2+} に起因するのか SO_4^{2-} によるものか同じ硫化物イオンを含む Na_2SO_4 と K_2SO_4 を用い調査したところ，着果誘起は Cu^{2+} に起因することが判明した．重金属イオンによって花柱 RNase 活性が抑制されたにもかかわらず，不和合性が打破されなかったのは，重金属イオンが花柱に含まれる *S*-RNase 以外の RNase を抑制している可能性が高い．すなわち，ナシ花柱には *S*-RNase 以外に強い活性をもつ *non-S*-RNase が含まれており（Norioka et al., 2007），また，重金属イオンによる活性抑制は RNase の種類によって異なるという事実があるためである（第 1 章，第 1 節）．

重金属イオンによる着果誘起に品種間差があり，その原因を探るため，重金属イオンによる各品種の花柱 RNase 活性抑制や花器内の重金属イオン含量を調べた．しかし，品種間差を説明できるような結果は得られず，また，自家不和合性の強さの品種間差との間にも相関は見られなかった．重金属イオンによって強く着果が誘起されるのは‘幸水’と‘秀玉’であり，‘二十世紀’は‘幸水’と‘秀玉’の先祖であるにもかかわらず，着果が誘起されなかった．一方，‘秀玉’は‘幸水’と‘菊水’の交配品種であることから，着果誘起のし易さは‘幸水’の有する品種特性が関与していると考えられた．

次に，重金属イオンによる着果誘起のメカニズムを調査した．‘幸水’の花器に処理したイオンが吸収されていることから，花器の内生重金属濃度には着果誘起する閾値が存在する

と考えた．しかし，各品種の内生重金属イオン濃度と着果誘起率との間には相関が見られなかった．また，重金属イオンとエチレンとの関連を調べた結果，重金属イオン処理は花そりからのエチレン発生量を抑え，花そりの ACC 合成酵素活性を抑制した．従って，重金属イオンはエチレン生成を抑制して着果誘起している可能性が高い．また，エチレン受容体をブロックしてエチレン発生量を抑制する 1-MCP 処理が，‘幸水’の落果を抑制したことを確認している（データ省略）．従って，重金属イオンはナシのエチレン受容体をブロックし，着果を誘起する効果を併せ持つ可能性も考えられる．一方，開花前の GA や CPPU 処理はナシの着果を誘起するが，そのほとんどは奇形果や有てい果である（データ省略）．しかし，重金属イオンやエチレン合成阻害剤である AVG によって着果した果実では有てい果はほとんど見られない．従って，重金属イオンが開花期の内生 GA やサイトカイニン合成系を刺激するというより，むしろエチレン合成阻害により着果誘起していると推察された．

Cu^{2+} を含むボルドー殺菌剤は， CuSO_4 溶液と同様に‘幸水’の着果を誘起した．開花前に処理するボルドー液は現在黒斑病・黒星病防除のために使われている化学農薬の代わりとなり，着果誘起と病害防除を同時に行える．さらに，ボルドー液処理は他家受粉よりも低い着果率であることから，受粉作業が不要で摘果作業を大幅に軽減する省力栽培が可能と考えられた．また，ボルドー液によって誘起された果実の肥大改善は，実用化に向けての課題であったが，開花 30 日後の GA

や CPPU 処理で他家受粉果と同じ大きさにすることができた。露地栽培における‘幸水’のボルドー省力栽培は、幾つかの改善すべき点はあるものの、人工受粉が不要で摘果労力が従来の栽培より 1/4 に軽減されることが実証された。また、‘幸水’の単一品種栽培が可能となり、ポジティブリスト制度への対応も可能となる。この省力栽培法は、‘幸水’栽培における労力軽減に大きく貢献することが期待されるため、効果の安定性も含めてさらに実証試験を深める必要がある。

ハウス‘幸水’におけるボルドー省力栽培は、露地栽培と同様に省力化が可能であったが、摘果作業の短縮率は露地より低かった。これは、ボルドーが露地栽培よりも高い着果誘起効果を示したためであり、ハウス内の環境がボルドー液の効果を高めたと考えられた。また、慣行のハウス‘幸水’より果実は小さめで熟期は若干遅れる傾向を示した。ボルドー誘起果は果実肥大初期から小さかったことから、果肉細胞の分裂に問題があり、これには果実内の種子の有無が関係すると考えられる。但し、慣行のハウス‘幸水’では 2 回の人工受粉とともに GA 処理が行われており、省力栽培の割にはボルドー区の果実はそれほど見劣りするものではなかった。一方、熟期の遅れについての原因は不明である。無核果したブドウの‘デラウェア’で見られるように、通常種無し果の熟期は早まる。これは、種子からの成長を促進する植物ホルモンが生産され続け、果実成長から果実成熟への移行が遅れるためと説明されているが、こういった現象は植物種によって異なるのかもしれない。以上の結果から、ボルドー省力栽培

はハウス‘幸水’にも応用できるが、慣行のハウス栽培並みの高品質果を生産するためには、果実肥大と適期を促進する技術の開発が必要である。

摘要

重金属塩処理によるニホンナシの着果誘起とその技術の栽培への利用について研究し，得られた結果は以下のように要約される．

- ① ニホンナシ ‘幸水’ の花柱RNase活性を抑制する重金属塩を探索し， CuSO_4 および ZnSO_4 は濃度依存的に抑制作用を示し， FeSO_4 には若干の抑制効果があることを明らかにした．また，重金属塩による抑制効果は，RNaseの種類によって異なることを認めた．
- ② ‘幸水’ の蕾への CuSO_4 処理は，高い着果誘起効果を示した．同じ硫化物イオンを含む Na_2SO_4 と K_2SO_4 には効果がなかったことから， Cu^{2+} が着果誘起していることを証明した．また， Cu^{2+} を含むボルドー殺菌剤を開花前に散布することにより，‘幸水’の着果が誘起されることを実証した．
- ③ 重金属塩処理後の自家花粉管伸長は促進されず，着果した果実内には種子が認められなかったことから，着果は単為結果であることを明らかにした．
- ④ エスレル処理は落果を誘起し，AVG処理では高い着果率を示したことから，エチレンが‘幸水’の落果に関与することを示した．さらに，ボルドー液処理は花そうからのエチレン発生量を抑制するとともに，花そうのACC合成酵素活性は CuSO_4 によって抑制されたことから，重金属イオン

による単為結果誘起はエチレン生成阻害によるものと推察した。

⑤ 開花期の雌蕊・花台における Fe^{2+} 濃度は、それぞれ 10～12 および 8～11 $\mu\text{g/gFW}$ であり、 Cu^{2+} 濃度は 6.5～9 および 3.5～6 $\mu\text{g/gFW}$ であった。 FeSO_4 処理後、 Fe^{2+} は雌蕊・花台内に徐々に吸収され、処理 12 日後に雌蕊で約 11 μg 、花台で約 25 $\mu\text{g/gFW}$ が吸収された。ボルドー液処理 12 日後の Cu^{2+} 吸収量は、雌蕊・花台ともに約 19 $\mu\text{g/gFW}$ であった。

⑥ 重金属イオンによる着果誘起には品種間差があり、‘幸水’や‘秀玉’は良く着果したが、‘ゴールド二十世紀’や‘豊水’での着果はほとんど認められなかった。着果誘起率と重金属イオンによる花柱 RNase 活性抑制程度、各品種の雌蕊・花台内における Fe^{2+} および Cu^{2+} 含量、各品種の自家不和合性の強さとの間に相関は見られなかった。

⑦ 着果に及ぼすボルドー液処理の効果は、萌芽期～開花 4 日後まで認められた。また、着果効果の年次変動を 6 年間にわたって調査した結果、開花期に低温や降雨に遭遇した年は、着果率の低いことが判明した。

⑧ ボルドー誘起果への GA や CPPU 処理は果実成長を大きく改善し、満開後 30 日の GA ペースト処理により他家受粉果と同程度の果実が得られることを明らかにした。

⑨ 露地栽培の‘幸水’において、ボルドー液処理は受粉作業

が不要なうえ摘果作業が大幅に短縮され，着果管理作業時間は従来の 1/4 となることが明らかとなった．さらに，収穫期が早まり，また，慣行栽培と同程度の収量が得られることを実証した．

- ⑩ ハウス栽培‘幸水’においては，ボルドー液処理は露地より高い結実率を誘起したため，着果管理作業の軽減率は低いことが明らかとなった．ハウス栽培では人工受粉と GA 処理が慣例化しているため，ボルドー液処理による果実は慣行のものより小さめとなり，熟期はやや遅れる等の問題点が示された．

Summary

In this study, fruit set induction by heavy metal salts and its use for cultivation were investigated in Japanese pear. Results obtained are summarized as follows.

- ① Copper sulfate and zinc sulfate significantly inhibited the stylar RNase activity of Japanese pear 'Kosui', and the inhibition was dose-dependent. The stylar RNase activity was also reduced slightly by FeSO_4 . The inhibitory effect by CuSO_4 varied among RNases tested, and the inhibition may be induced by structural alteration of RNase protein.
- ② The 2mM CuSO_4 application 8 days before anthesis induced more than 30% fruit set following self-pollination but not by Na_2SO_4 or K_2SO_4 . Therefore, Cu^{2+} causes fruit set.
- ③ Heavy metal ions induced parthenocarpy but not breakdown of self-incompatibility in 'Kosui', because heavy metal ions did not promote the self-pollen tube growth in the style and almost no seed was formed in the fruit.
- ④ Ethylene treatment before anthesis caused fruit abscission, whereas AVG (ACC synthase inhibitor) accelerated parthenocarpic fruit set in 'Kosui'. Since Cu^{2+} also inhibited ethylene production from flower cluster and ACC synthase activity of 'Kosui', the inhibition of ethylene synthesis and/or ethylene evolution may involve in parthenocarpic fruit set by heavy metal ions.
- ⑤ During flower development, Fe^{2+} concentrations in

pistil and bourse were almost constant, 10-12 and 8-11 μ g/gFW, respectively. Copper ion concentrations were 6.5-9 and 3.5-6 μ g/gFW in pistil and bourse, respectively. Both ions were absorbed gradually into the tissues after FeSO₄ and CuSO₄ treatments. At 12 days after treatment, amounts of absorbed ion were as follows; Fe²⁺ in pistil = 11 μ g/gFW, Fe²⁺ in bourse = 25 μ g/gFW, Cu²⁺ in pistil = 19 μ g/gFW, and Cu²⁺ in bourse = 19 μ g/gFW.

- ⑥ The degree of fruit set induction by heavy metal ions was varied among cultivars. However, this cultivar differences could not be explained by the degree of stylar RNase inhibition by heavy metal ions, internal Fe²⁺ and Cu²⁺ concentrations, or self-incompatibility strength of the cultivar.
- ⑦ Bordeaux mixture, which contains copper ion, could induce parthenocarpic fruit set in 'Kosui'. The effective stage for inducing parthenocarpy was during sprouting time and 4 days after anthesis. When annual changes in the effectiveness were investigated for 6 years, the fruit set diminished in the years with low temperature and/or ralinfall during flowering season.
- ⑧ GA paste applied to the stalk of Bordeaux-induced fruit 30 days after anthesis greatly improved the fruit growth; the weight was almost the same as cross-pollinated one.
- ⑨ The labor-saving cultivation method was tried to establish by using Bordeaux mixture in open field cultivation. When Bordeaux mixture was sprayed before anthesis, only 25% labor-time was needed for artificial

pollination and fruit thinning practices compared to conventional cultivation. Nevertheless, the fruit size and yield were almost the same as conventional cultivation, and harvest time became much earlier.

- ⑩ The labor-saving cultivation method was also tried to establish in greenhouse cultivation by using Bordeaux mixture. Although the labor-time was much saved, fruit quality was not as good as conventional one. The fruit size was smaller and harvest time somewhat delayed compared with conventional cultivation. This may be due to GA treatment and artificial pollination in conventional greenhouse cultivation.

謝 辞

本実験の遂行および本論分をまとめるにあたり，直接の御指導を賜った三重大学大学院生物資源学研究科園芸植物機能学研究室 平塚 伸教授に対して深甚の謝意を表します．

御助言と御校閲の労を賜った三重大学生物資源学部 名田和義准教授，奥田均教授，掛田克行教授に対し謹んで感謝の意を表します．

本実験に用いたサンプルを提供して頂いた三重大学生物資源学部附属農場 前川豊孝様，三重県農業研究所 伊藤 寿様，三井友宏様，一部データの統計処理に協力いただいた塚田森生准教授に厚く御礼申し上げます．

最後に，大学から博士後期課程まで様々な面で支えてくれた両親に深く感謝の意を表します．

引用文献

- Anderson, M. A., E.C. Cornish, S-L. Mau, E. G. Williams, R. Hoggart, A. Atkison, I. Boning, B. Grego, R. Simpson, P. J. Roche, J. D. Haley, J. D. Penschow, H. D. Niall, G. W. Tegear, J. P. Coghlan, R. J. Crawford and A. E. Clarke. 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 321: 38-44.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, P. H. and T. H. D. Ho, 1986. Barley aleurone layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid. *Plant Physiol.* 82: 801-806.
- Child, R. D. and R. R. Williams. 1983. The effects of the interaction of aminoethoxyvinylglycine (AVG) with mixtures of growth regulators on fruit set and shape in Cox's Orange Pipin apple. *J. Hort. Sci.* 58: 365-369.
- Chung, I. K., I. S. Chung, G. Nam, S. Yu and H. Kan. 2005. Self-incompatibility regulation and its regulatory methods in plants. Korean Patent No. 10-0467936.
- Dal, C. V., M. Danesin, A. Boschetti, A. Dorigoni and A. Ramina. 2005. Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. *Borck*). *J. Exp. Bot.* 56: 2995-3005.

Edgertone, L. J. 1971. Apple abscission. HortScience 6:
26-30.

Fukui, H., S. Imakawa and T. Tamura. 1984. Relation
between early drop of apple fruit, ethylene evolution
and formation of abscission layer. J. Jpn. Soc. Hort. Sci.
58: 303-307.

Gomez, C. A., J. Mehouchi, F. R. Tadeo, M. E. Primo and
M. Talon. 2000. Hormonal regulation of fruitlet
abscission induced by carbohydrate shortage in citrus.
Planta: 636-643.

林田大志・堀川晃宏・平塚伸・名田和義. 2009. ニホンナシ
の自家不和合性に関する研究. (第54報) 重金属イオンに
よる自家不和合性打破. 園学研. 8 (別2) : 129.

平塚伸・堀川晃宏・名田和義・伊藤寿・大野秀一・三井友宏・
加田弘. 2009. リンゴの自家不和合性打破剤のニホンナシ
に対する効果の検証. 園学研. 8: 469-473.

Hiratsuka, S. and T. Tezuka. 1980. Changes in proteins in
pistils after self- and cross-pollination in Japanese
pear. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 49: 57-64.

平塚伸・渡辺学・河合義隆・前島勤・川村啓太郎・加藤尉行.
2002. ニホンナシに対するギ酸カルシウムの摘花作用.
園学雑. 71: 62-67.

Hiratsuka, S., S. L. Zhang, E. Nakagawa and Y. Kawai.

2001. Selective inhibition of the growth of incompatible pollen tubes by S-protein in the Japanese pear. Sex. Plant Reprod. 13: 209-215.
- Huang, S., H.S. Lee, B. Karunanandaa and T.H. Kao. 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S protein is essential for rejection of self-pollen. Plant Cell 6: 1021-1028.
- 市村一雄. 2000. 品質保存剤の成分. p. 66-75. 市村一雄. 切り花の鮮度保持. 筑波書房. 東京
- Iglesias, D. J., F. R. Tadeo, M. E. Primo and M. Talon. 2006. Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. Trees 20: 348-355.
- 猪俣雄司・八重垣英明・鈴木邦彦. 1993. ジベレリン散布によるニホンナシの晩霜害軽減対策. 農業気象. 49: 105-109.
- Kawata, Y., F. Sakiyama and H. Tamaoki. 1988. Amino-acid sequence of ribonuclease T₂ from *Aspergillus oryzae*. Eur. J. Biochem. 176: 683-697.
- Kim, M. H., D. I. Shin, H. S. Park and I. K. Chumg. 2001. *In vitro* function of S-RNases in *Lycopersicon peruvianum*. Mol. Cells 12: 329-335.
- 気象庁HP. <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php?sess=6ef525a9cdef28cea634ce58ca736e68>.

厚生労働省HP. 食品中の残留農薬など.

http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/zanryu/index.html.

Kowyama, Y., C. Kunz, I. Lewis, E. Newbigin, A.E. Clarke and M. A. Anderson. 1994. Self-compatibility in a *Lycopersicon peruvianum* variant (LA2157) is associated with a lack of style S-RNase activity. Theor. Appl. Genet. 88: 859-864.

Leopold, A. C. 1971. Physiological process involved in abscission. HortScience 6: 376-378.

Lizada, C. M. C. and S. F. Yang. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Anal. Biochem. 100: 140-145.

MacDaniels, L. H. 1936. Some anatomical aspects of apple flower and fruit abscission. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 34: 122-129.

Magnelli, P. E., A. M. Bielik and E. P. Guthrie. 2011. Identification and characterization of protein glycosylation using specific endo- and exoglycosidases. J. Vis. Exp. 58: e3749, <http://dx.doi.org/10.3791/3749>.

Maruyama, T., S. Sonokawa, H. Matsushita and M. Goto. 2007. Inhibitory effects of gold (III) ions on ribonuclease and deoxyribonuclease. J. Inorg. Biochem. 101: 180-186.

McClure, B. A., P. R. Haring, M. A. Ebert, Anderson, R. J. Simpson, F. Sakiyama and A. E. Clarke. 1989. Style

- self-incompatibility gene produce of *Nicotiana alata* are ribonucleases. Nature 342: 955-957.
- McCubbin, A. G., Y.Y. Chung and T.H. Kao. 1997. A mutant S_3 -RNase of *Petunia inflata* lacking RNase activity has an allele-specific dominant negative effect on self-incompatibility interactions. Plant Cell 9: 85-95.
- 中嶋香織. 2006. ニホンナシの自家不和不和合性に関する研究 - 特に S-RNase の発現・機能について -. 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文.
- de Nettancourt, D. 1977. Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag. New York.
- 西川 論・森岡弘志・池原森男. 1987. リボヌクレアーゼ T₁. p. 146-160. 崎山文夫. 蛋白質工学入門. 秀潤社. 東京.
- Norioka, S., C. Oneyama, S. Takuma, T. Shinkawa, T. Ishimizu, T. Nakanishi and F. Sakiyama. 2007. Purification and characterization of a non-S-RNase and S-RNases from styles of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Plant Physiol. Biochem. 45: 878-886.
- 農林水産省 HP. 農林水産省/果樹生産出荷統計. <http://www.estat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001083656>.
- 大友忠三. 2005. 着果量を支配する条件. p. 基35. 農業技術大系果樹編. 3. ナシ 西洋ナシ. 追録第20号. 農文協. 東京.

- Qin, X., B. Liu, J. Soulard, D. Morse and M. Cappadocia. 2006. Style-by-style analysis of two sporadic self-compatible *Solanum chacoense* lines supports a primary role for S-RNases in determining pollen rejection thresholds. J. Exp. Bot. 57: 2001-2013.
- R Development Core Team. 2010. R: a language and environment for statistical computing.
- Royo, J., C. Kunz, Y. Kowiyama, M. Anderson, A.E. Clarke and E. Newbigin. 1994. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 6511-6514.
- Suzuki, A., H. Iwanaga, T. Maotani and Y. Murakami. 1988. Relationship between changes in ethylene evolution and physiological drop of persimmon fruit. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 57: 167-172.
- 多比良和生・田中仁士・片桐澄雄・檜山博也. 1999. ニホンナシ摘らいが摘果時間と果実肥大に及ぼす影響. 茨城県農総センター園研報告. 7: 11-15.
- Tudela, D. and M. E. Primo. 1992. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. Plant Physiol. 100: 131-137.
- 渡邊浩樹・金原啓一・小島耕一. 2003. ニホンナシ「幸水」

- のハウス内の気温が変形果の発生に及ぼす影響．栃木農試研報．52: 47-54.
- 築取作次．1991．作業体系の改善．p. 531．果樹園芸大事典編集委員会．果樹園芸大事典．養賢堂．東京．
- 安延義弘．1981．ニホンナシ栽培におけるジベレリンペーストの利用と効果．農及園．56: 1507.
- 米山寛一．1991．自然受粉と人工受粉．p. 552．果樹園芸大事典編集委員会．果樹園芸大事典．養賢堂．東京．
- Zhang, C., U. Lee and K. Tanabe. 2008. Hormonal regulation of fruit set, parthenogenesis induction and fruit expansion in Japanese pear. *Plant Growth Regul.* 55: 231-240.
- Zhang, C., K. Tanabe, F. Tamura, A. Itai and M. Yoshida. 2007. Role of gibberellins in increasing sink demand in Japanese pear fruit during rapid fruit growth. *Plant Growth Regul.* 52: 161-172.
- Zhang, C., K. Tanabe, F. Tamura, K. Matsumoto and A. Yoshida. 2005. ^{13}C -photosynthate accumulation in Japanese pear fruit during the period of rapid fruit growth is limited by the sink strength of fruit rather than by the transport capacity of the pedicel. *J. Exp. Bot.* 56: 2713-2719.
- 張紹鈴．1999．ニホンナシにおける自家不和合性の強さの品種間差について．三重大学大学院生物資源学研究科博士

論文.

Zou, J., K. Kajita and N. Sugimoto. 2001. Cu^{2+} inhibits the aggregation of amyloid-peptide (1-42) *in vitro*. Angew. Chem. Int. Ed. 40: 2274-2277.