



Title	寒冷地における醸造用ブドウの耐凍性と組織内成分との関連性および耐凍性推定モデルの構築に関する研究
Author(s)	来田, 祐太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16758号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16758
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99603
Type	doctoral thesis
File Information	KITA_Yutaro.pdf, 全文



寒冷地における醸造用ブドウの耐凍性と組織内成分との関連性

および耐凍性推定モデルの構築に関する研究

北海道大学大学院農学院

農学専攻 生産フロンティアコース博士後期課程

来 田 祐 太 朗

目次

第1章 緒論	7
第2章 ブドウ越冬芽および当年生枝の耐凍性と組織内成分含量の季節変動	10
第1節 越冬芽の耐凍性と含水率および可溶性炭水化物との関連	10
2-1-1. 緒言	10
2-1-2. 材料および方法	11
2-1-2-1. 植物材料	11
2-1-2-2. 気象データ	11
2-1-2-3. 耐凍性試験	11
2-1-2-4. 含水率測定	12
2-1-2-5. 可溶性炭水化物含量の定量分析	12
2-1-2-6. 統計解析	13
2-1-3. 結果	14
2-1-3-1. 越冬芽の耐凍性の季節変動と品種間差異	14
2-1-3-2. 越冬芽の含水率および可溶性炭水化物組成の季節変動と品種間差異	14
2-1-3-3. 越冬芽の耐凍性と含水率および可溶性炭水化物との関連	15
2-1-4. 考察	17
2-1-4-1. 越冬芽の耐凍性の季節変動および品種間差	17
2-1-4-2. 越冬芽の耐凍性と含水率の関連	18

2-1-4-3. 越冬芽の耐凍性と各可溶性炭水化物含量の関連	18
--------------------------------	----

第2節 越冬芽および当年生枝における耐凍性と含水率、可溶性炭水化物、プロリン

および総ポリフェノール含量との関連性	34
2-2-1. 緒言	34
2-2-2. 材料および方法	35
2-2-2-1. 植物材料	35
2-2-2-2. 気象データ	35
2-2-2-3. 耐凍性試験	35
2-2-2-4. 含水率測定	36
2-2-2-5. 可溶性炭水化物含量の定量分析	36
2-2-2-6. プロリン含量の定量分析	37
2-2-2-7. 総ポリフェノール含量の定量分析	37
2-2-2-8. 統計解析	37
2-2-3. 結果	38
2-2-3-1. 越冬芽および当年生枝の耐凍性の季節変動と品種間差異	38
2-2-3-2. 越冬芽の含水率、可溶性炭水化物、プロリンおよび 総ポリフェノール含量の季節変動および品種間差	38

2-2-3-3. 当年生枝の含水率、可溶性炭水化物、プロリンおよび	
総ポリフェノール含量の季節変動と品種間差	39
2-2-3-4. 耐凍性と含水率および組織内成分との関連	39
2-2-4. 考察	41
2-2-4-1. 越冬芽および当年生枝における耐凍性の季節変動および品種間差	41
2-2-4-2. 越冬芽および当年生枝における耐凍性と可溶性炭水化物含量の関連	41
2-2-4-3. 越冬芽および当年生枝における耐凍性と組織内成分の関連	42
第3節 越冬芽および当年生枝における耐凍性と含水率、可溶性炭水化物、アミノ酸	
および各種ポリフェノール含量との関連性	51
2-3-1. 緒言	51
2-3-2. 材料および方法	52
2-3-2-1. 植物材料	52
2-3-2-2. 気象データ	52
2-3-2-3. 耐凍性試験	52
2-3-2-4. Cryo-SEM を用いた凍結前後の越冬芽細胞の観察	52
2-3-2-5. 含水率測定	53

2-3-2-6. 可溶性炭水化物含量の定量分析	53
2-3-2-7. デンプン含量の定量分析	53
2-3-2-8. アミノ酸含量の定量分析	54
2-3-2-9. フェノール化合物含量の定量分析	55
2-3-2-10. 統計解析	55
2-3-3. 結果	57
2-3-3-1. 越冬芽および当年生枝における耐凍性の季節変動と品種間差異	57
2-3-3-2. 低温条件における越冬芽の形態	57
2-3-3-3. 越冬芽および当年生枝の含水率の季節変動と品種間差異	58
2-3-3-4. 越冬芽および当年生枝の可溶性炭水化物含量の季節変動および品種間差	58
2-3-3-5. 越冬芽および当年生枝のアミノ酸含量の季節変動および品種間差	60
2-3-3-6. 越冬芽および当年生枝のフェノール化合物含量の季節変動および品種間差	61
2-3-3-7. ブドウ 3 品種の耐凍性と含水率および組織内成分との関連	61
2-3-4. 考察	63
2-3-4-1. 越冬芽および当年生枝における耐凍性評価方法	63
2-3-4-2. 越冬芽および当年生枝における耐凍性と可溶性炭水化物含量の関連および 品種間差	64

2-3-4-3. 越冬芽および当年生枝における耐凍性とアミノ酸の関連	65
------------------------------------	----

2-3-4-4. 越冬芽および当年生枝における耐凍性とフェノール化合物の関連	66
--	----

第 3 章 含水量および可溶性炭水化物含量を用いたブドウ越冬芽の耐凍性推定 モデルの構築	83
---	----

3-1. 緒言	83
---------	----

3-2. 材料および方法	85
--------------	----

3-2-1. 植物材料、耐凍性および含水量データ	85
--------------------------	----

3-2-2. モデル構築	85
--------------	----

3-2-3. モデル検証	86
--------------	----

3-3. 結果	89
---------	----

3-3-1. ‘ピノ・ノワール’の越冬芽における耐凍性、含水量および	
------------------------------------	--

可溶性炭水化物含量の季節変動	89
----------------	----

3-3-2. 耐凍性と含水率および各可溶性炭水化物含量との関連	90
---------------------------------	----

3-3-3. 可溶性炭水化物含量および含水量に基づく耐凍性モデルの構築および検証	90
--	----

3-4. 考察	91
---------	----

3-4-1. ‘ピノ・ノワール’の越冬芽における耐凍性と含水量および可溶性炭水化物含量	
---	--

との関連	91
3-4-2. 耐凍性推定モデル4種類の比較検討	91
第4章 総合考察	112
摘要	116
謝辞	118
引用文献	119

第1章 緒論

北海道は夏季に冷涼な亜寒帯気候に区分される。北海道では 20 世紀後半まで、4 月から 10 月の生育期の積算温度が不足し冬季の低温も厳しいことから、欧州系品種 (*Vitis vinifera*) をはじめとする醸造用ブドウの栽培は困難とされてきた (広田ら, 2017)。そのため、1960 年代以降、北海道では耐寒性の強い品種の選抜および育成が進められてきた。例えば、十勝地方の池田町ブドウ・ブドウ酒研究所では、*V. vinifera*、*V. rupestris*、*V. labrusca* などを掛け合わせた交雑種である‘セイベル 13053’をもとに、その枝変わり品種である‘清見’や、‘清見’と耐凍性の強い *V. amurensis* を交雑した‘清舞’および‘山幸’など強耐凍性品種が育成された (Fisher, 1980; Hirota et al., 2006)。これと並行して、北海道と類似した冷涼な気候を持つドイツ品種の導入が旧北海道立農業試験場 (現在の北海道立総合研究機構) において試みられ、赤ワイン用品種である‘ツヴァイゲルトレーベ’および‘セイベル 13053’ならびに、白ワイン用品種である‘ケルナー’および‘ミュラートウルガウ’などが栽培に適することが明らかにされた (北海道農政部, 2022; 北海道立中央農業試験場園芸部果樹園芸科, 1981a, 1981b, 1981c)。また、近年神奈川県で発見された‘メイヴ’は、冬季に -30°C に達する北海道東部の遠軽町で約 20 年にわたり栽培されてきた歴史があり、強い耐凍性を有することが示唆されている (田中・石村, 2020)。しかし、耐凍性が強い理由について学術的に明らかになっていない。

夏季に冷涼な北海道であったが、1990 年代後半以降は気候変動の影響によりブドウ生育期の気温は上昇傾向にあり、フランス原産品種である‘ピノ・ノワール’の最適生育温度の下限とされる 14°C を確保できる年が増加した (Jones et al., 2005; 広田ら, 2017)。その結果、‘ピノ・ノワール’を用いた高品質ワインの生産が可能となり、2003 年リリースの‘ピノ・ノワール’を原料とするワインが高く評価されたことを契機として、同品種の栽培が急速に拡大した (永田ら, 2014)。北海道における赤ワイン用品種において、‘ピノ・ノワール’の栽培面積は、2019 年に‘ツヴァイゲルトレーベ’のそれを上回り、最大の作付面積を占める品種となっている (広田ら, 2017; 北海道農政部, 2022)。

このように、夏季の気温上昇に伴う積算気温の増大によって北海道で栽培可能な醸造用ブドウ品種が拡大した一方で、厳冬期の最低気温は依然として低く、醸造用ブドウ栽培の重大な制限要因である (北海道農政部, 2022)。低温ストレスは、植物の生育を阻害する非生物学的ストレス要因であり (Thomashow, 1999)、特に致死的な細胞内凍結が生じた場合、越冬性作物に甚大な被害をもたらす (Arakawa et al., 2018)。ここで注意すべきは、現在進行しつつある気候変動が、単なる気温の上昇にとどまらず、醸造用ブドウの温度環境への適応を攪乱し、凍害リスクを高める可能性があることである。例えば、秋季における高温は、果樹の耐凍性

獲得が不十分となる事象を招き、結果として凍害リスクを高める可能性も指摘されている (Sakamoto et al., 2017)。さらに、冬季から早春にかけての温暖化傾向は、一見すると越冬に有利に働くように思えるが、特にブドウが低温要求量を満たし他発休眠中にある状態において、一時的な昇温によりブドウが早期に耐凍性の喪失を起こす。この生理状態の変化は、その後の低温、すなわち寒の戻りに対する脆弱性を高め、晩霜害のリスクを増大させる要因となる (Londo and Kovaleski, 2019)。

温帯以北に生育する木本植物は、秋季の短日および非凍結温度の低温を感知して成長を停止し、休眠へと移行するとともに、細胞内の生理状態を変化させて耐凍性を獲得する (Arakawa et al., 2018)。この過程は低温馴化と呼ばれる。低温馴化の過程で植物は、組織内の含水率を低下させ、可溶性炭水化物およびアミノ酸などの成分を増加させるとともに、膜脂質の組成および細胞壁の構造を変化させることで耐凍性を高める (Thomashow, 1999)。一方、春季に気温の上昇に伴って、低温馴化期に獲得した耐凍性を急速に失う。この過程は脱馴化と呼ばれる。

氷点下の環境において、ブドウ越冬芽は深過冷却および部分的な凍結脱水により細胞内凍結を回避するのに対し、当年生枝は細胞外凍結により耐凍性を維持することが知られている (Kasuga et al., 2020; Mills et al., 2006)。これまでの研究で、越冬芽および当年生枝において、低温馴化に伴い組織含水率が低下し、可溶性炭水化物、プロリンおよび総フェノール含量 (TPC) などが増加し、それらがブドウ越冬芽と当年生枝の耐凍性向上に寄与することが報告されている (Ershadi et al., 2016; Grant and Dami, 2015; Jones et al., 1999; Karimi, 2020; Todaro and Dami, 2017)。このうち、可溶性炭水化物は浸透圧調節物質として働くほか、ラフィノースおよびスタキオースなどのラフィノースファミリーオリゴ糖 (RFO) は、細胞膜構造の保護機能およびその抗酸化作用などを介して耐凍性向上に寄与すると考えられている (Hinch et al., 2003; Nishizawa et al., 2008)。しかし、これらの知見の多くは比較的温暖な地域にみられる現象で、さらに特定の品種に限られており、北海道のような寒冷地において、遺伝的背景の異なる多様な品種がどのような成分を蓄積して耐凍性を獲得しているかについての包括的な理解は十分ではない。とりわけ、温暖化に伴い導入が進んだ‘ピノ・ノワール’のような欧州系品種は、北海道在来の交雑種と比較して耐凍性が弱い傾向にある上、こうした気象変動に対する生理的な反応も異なると予想される。したがって、将来的なブドウ果実の安定生産を実現するには、これらの品種が北海道の気象条件下で獲得可能な最大の耐凍性および、その獲得に必要な要因を正確に評価し、栽培適性の限界を明らかにすることが必要と考えられる。

また、栽培現場における実用的な課題として、耐凍性の評価手法が挙げられる。今日、耐

凍性の評価には主に凍結処理試験の結果に基づいて算出される LT₅₀ (50%致死温度) が用いられて評価されることが多いが (Ershadi et al., 2016; Horiuchi et al., 2021)、これには多大な労力と時間を要するため、生産者がリアルタイムで凍害リスクを把握することは容易ではない。

近年、アメリカのコネル大学およびウィスコンシンマディソン大学などを中心として気温を説明変数とするブドウ越冬芽の耐凍性予測モデルが開発されており (Ferguson et al., 2014, 2011; Kovaleski et al., 2023; Londo and Kovaleski, 2025; North et al., 2022; North and Kovaleski, 2024; Wang et al., 2024)、アメリカでは地域と品種を入力すると凍害リスクを可視化できるツールが開発されている (<https://newa.cornell.edu/grape-cold-hardiness/>、https://cornell-tree-fruit-physiology.shinyapps.io/North_America_Grape_Freezing_Tolerance/)。

しかし、気温のみを説明変数とする既存モデルでは、栽培条件の違いに起因する生理的変化を適切に再現できない可能性がある。ブドウは同じ気温の暴露を受けた圃場においても、樹齢 (Kaya et al., 2024)、仕立て方法 (Behrooz et al., 2025)、剪定強度や摘房の程度 (Wilson et al., 2014)、窒素施用量 (Wample et al., 1993) などの栽培管理条件の違いによって、越冬芽の組織内成分が変化し、結果として耐凍性が変動することが報告されている。したがって、仮に特定の成分または生理指標に基づき耐凍性を簡便かつ高精度に推定できれば、凍害対策の判断支援ツールとして極めて有用になるものと思われる。

そこで本研究では、北海道の醸造用ブドウ栽培において重要な課題の 1 つである、越冬期の耐凍性にかかわる生理学的要因を解明し、その知見に基づき耐凍性推定モデルを構築しようと考えた。すなわち、第 2 章において、北海道で広く栽培される耐凍性の異なる複数のブドウ品種 (欧州種、北米種、野生種交配品種など) を対象に、越冬芽および当年生枝の耐凍性ならびに、含水率、可溶性炭水化物、アミノ酸およびフェノール化合物などの成分動態を 3 シーズンにわたり調べ、両者の関係を詳細に解析することで、耐凍性成立の主要因および品種間差が生じる理由の解明を目指した。次に、第 3 章では、第 2 章で得られた知見を統合し、耐凍性と最も強い関連を示した生理指標を説明変数とする耐凍性推定モデルを構築し、その予測精度および適用可能性を検証した。

第2章 ブドウ越冬芽の耐凍性と含水率および可溶性炭水化物含量の季節変動

第1節 越冬芽の耐凍性と含水率および可溶性炭水化物との関連

2-1-1. 緒言

ブドウ越冬芽は樹体内で凍害を最も受けやすい器官であり、凍害を受けると翌シーズンの果実収量が大きく低下し、さらには樹体の回復に数年の期間を要する (Dami et al., 2012; Svyantek et al., 2020)。したがって、北海道などの寒冷地におけるブドウ栽培において、越冬芽の耐凍性を十分に確保することは極めて重要である。

ブドウ越冬芽は、過冷却および凍結脱水により細胞内凍結を回避することで、氷点下の低温条件下でも生存可能であることが知られている (Kasuga et al., 2020; Mills et al., 2006)。この過冷却状態にある越冬芽の茎頂組織が細胞内凍結をする際には、水の凝固に伴う潜熱（発熱）が生じる (Mills et al., 2006)。示差熱分析 (Differential thermal analysis : DTA) は、この細胞内凍結に伴う発熱ピーク (Low Temperature Exotherm : LTE) を検出することで、組織の凍結致死温度を正確に特定できるため、ブドウ越冬芽の耐凍性を評価する有効な手法の一つとなっている (Kaya, 2020)。

また、ブドウ越冬芽の耐凍性獲得およびその維持には、組織内の含水率および組織内成分の変化が密接に関与していることが報告されている (Jones et al., 1999; Ershadi et al., 2016)。とりわけ可溶性炭水化物は、浸透圧調節物質および凍結保護物質として機能し、過冷却中の細胞内溶液の安定化や細胞の保護に寄与することが多くの植物で報告されている (酒井, 1982)。しかしながら、北海道の主要な醸造用ブドウ品種における耐凍性とこれら組織内成分の季節的変動およびその関連についての知見は乏しい。

そこで本節では、北海道で広く栽培される醸造用ブドウ 9 品種および耐凍性が強いとされる新品種の‘メイヴ’について、示差熱分析を用いて越冬芽の耐凍性を評価するとともに、耐凍性の季節変動と含水率および可溶性炭水化物含量の変動との関連について検討した。

2-1-2. 材料および方法

2-1-2-1. 植物材料

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター実験農場(北海道札幌市、北緯 43°04'15"、東経 141°20'21") に植栽されている、6 年生の *Vitis* 属の 10 品種を供した (Table 1)。これらは、いずれも道内で広く栽培されている品種である (北海道農政部, 2022)。すべての品種は株間 1.2 m×3.0 m、高さ 60 cm の短梢剪定垣根仕立て (片側水平コルドン) で栽培された。越冬芽の採取は 2023 年 10 月 7 日から 2024 年 4 月 13 日まで、1、2 または 4 週間間隔で合計 12 回行った。越冬芽の採取部位は当年生枝の下部から越冬芽を 2 個残し、その上部 15 節分とした。採取した当年生枝は、乾燥を防ぐため圃場でチャック付きのポリエチレン袋に入れ密封し、氷を入れた発泡スチロールの箱に入れて速やかに実験室に運んだ。実験に際し、これらの越冬芽の着生位置は区別せず、ランダムに耐凍性評価、含水率測定および可溶性炭水化物分析に供した。なお、‘山幸’については、3 月 30 日以降に、実験圃場の当年生枝が全て枯死していたため、当該時期のデータは欠損している。

2-1-2-2. 気象データ

実験圃場における日最高気温、日最低気温、日平均気温および積雪量のデータは、農研機構メッシュ農業気象データシステム (The Agro-Meteorological Grid Square Data System、NARO) (https://amu.rd.naro.go.jp/wiki_open/doku.php?id=start) (大野ら, 2016) を用いて取得した。

2-1-2-3. 耐凍性試験

耐凍性試験は先行研究に記載された方法に従い、示差熱分析によって行った (Horiuchi et al., 2021; Tsumura et al., 2019)。本分析は、熱電対線を試料に取り付け冷却し、致死的な細胞内凍結に伴う発熱ピークを検出することで耐凍性を評価する。ブドウ越冬芽では、冷却過程において通常 2 種類の発熱ピークが検出される。まず -10°C 付近において、越冬芽の細胞外の水分が凍結することに由来する高温発熱 (High Temperature Exotherm: HTE) が生じる (Fig. 2 D)。続いて、さらに温度が低下した際に、過冷却状態にあった茎頂組織の細胞内の水が凍結することに由来する低温発熱 (Low Temperature Exotherm: LTE) が生じる (Mills et al., 2006; Fig. 2 D)。本研究では先行研究と同様に、この LTE が生じた温度を細胞の致死温度とみなし、耐凍性の基準とした。すなわち、LTE の発生温度が低いほど、耐凍性が強いことを示す。

実験の具体的な方法は、まず1つの越冬芽を含む約3 cmの枝片を、剪定鋏を用いて切り出した (Fig. 2 A 左)。次に各越冬芽の表面に熱電対を密着させ、パラフィルムを巻いて固定した (Fig. 2 B)。これらの越冬芽を 50 mL 容スクリーキャップ瓶に入れて、プログラムフリーザー (Mini-Subzero MC-710、タバイエスベック、日本) 内に 4°C で 1 時間保持した (Fig. 2 B, C)。次に、越冬芽を 5°C/h の速度で -40°C まで冷却した。この場合、対照として 70°C で 3 日間以上乾燥させた試料を同様に冷却した (Fig. 2 A 右)。冷却中における熱電対の温度変化はデータロガー (GM10-1JO/MT、GM90PS、横河電機株式会社、日本) で 2 秒ごとに記録した。得られた新鮮な越冬芽と乾燥した越冬芽の温度曲線の差から LTE が生じた温度を求めた (Fig. 2 D)。

2-1-2-4. 含水率測定

含水率測定は、全 12 回の採取のうち、11 月 25 日から翌年 4 月 14 日までの 10 回分について行った。各越冬芽の新鮮重 (FW) を 0.01 mg 単位の電子天秤を用いて秤量後、70°C で 3 日間乾燥させ、乾燥重 (DW) を同様に測定した。その後、次式に従い含水率を算出した。乾燥後の越冬芽は、後述の可溶性炭水化物定量分析に供した。

$$\text{含水率(\%)} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{FW}} \times 100$$

2-1-2-5. 可溶性炭水化物の定量分析

越冬芽の可溶性炭水化物は、Horikawa et al. (2019) に記載の方法を一部改変した方法で抽出し、メーカーのテクニカルレポート (https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/applications/application_note/18274/an_01-00427-jp.pdf) に記載された手法を一部改変して LC-MS によって定量した。

具体的には、乳鉢と乳棒を用いて粉末状にした越冬芽に 80% (v/v) エタノール 1,000 μL および内部標準物質として 5.00 mM キシリトール水溶液 300 μL を加え、70°C のドライバスで 30 分間インキュベートする方法で抽出した。抽出後 25°C、14,000 $\times g$ 、10 分間遠心分離し、得られた上清を遠心エバポレーターにかけてエタノールを除去し乾固させた。乾固した抽出物に、超純水 500 μL を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後、超音波洗浄機 (35W、UT-51N、Sharp、日本) で 10 分間超音波処理を行った。これを 14,000 $\times g$ 、10 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を 300 μL 分取し、これにアセトニトリル 600 μL を加

え、ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌した。攪拌後の混合液をメンブレンフィルター（PTFE、0.22 μm 、DISMIC[®]-13HP、ADVANTEC、日本）で濾過し、HPLC バイアル（Shim-vail H、島津製作所、日本）に移した。

分析には高速液体クロマトグラフ Nexera[™]（島津製作所）とシングル四重極質量分析計 LCMS-2050（島津製作所）を用いた。分析条件は以下の通りである。LC 条件；移動相：(A) 2.5 mmol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液、(B) 25 mmol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液：アセトニトリル = 10 : 90 (v/v)；グラジエント：0–9 分 75% (B)、9–10 分 75–10% (B)、10–14 分 10% (B)、14–14.5 分 10–75% (B)、14.5–15.5 分 75% (B)；カラム：Asahipak NH2P-50 3E (3.0×250 mm、粒子径 4 μm 、Shodex、日本)；カラム温度：30°C (CTO-40C；島津製作所)；流速：0.3 mL/min；オートサンプラー：SIL-40C（島津製作所）；注入量：2 μL 。

MS 条件；イオン化法：デュアルイオン化モード (ESI/APCI, DUIS)、ネガティブイオンモード、測定モード：SIM、ネブライザーガス：N₂、3.0 L/min、ドライガス：N₂、450°C、5.0 L/min、インターフェイス電圧：-2.0 kV。

各可溶性炭水化物のピーク面積は Labsolutions（島津製作所）を用いて算出し、内部標準法によりグルコース、フルクトース、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースのそれぞれの含量を越冬芽の乾燥重 1 g あたりの値として求めた。また、これらの可溶性炭水化物を足し合わせたものを総可溶性炭水化物 (TSC; Total Soluble Carbohydrate) 含量の目安として算出した。

2-1-2-6. 統計解析

すべての統計解析は統計解析ソフトウェア R (ver. 4.3.1) および Statcel 4 (Microsoft Excel 2019 のアドインソフト) を用いて行った。耐凍性、含水率および各可溶性炭水化物含量について、各採取時期における品種間差および同一品種における採取時期間差を、Tukey-Kramer の多重比較検定により解析した。また、耐凍性と含水率および可溶性炭水化物含量の相関関係について、ピアソンの積率相関係数を用いて検定し、相関係数の大きさに合わせてヒートマップで示した。なお、すべての検定において、有意水準は 5%未満 ($P < 0.05$) に設定した。

2-1-3. 結果

2-1-3-1. 越冬芽の耐凍性の季節変動と品種間差異

実験期間中の圃場の日最低気温は、2023 年 10 月 8 日に低温馴化を促進するとされる 10°C 以下となり、その後同年 11 月 11 日に初めて氷点下を記録した (Fig. 1 A)。2024 年 3 月 29 日まで氷点下の日が多くみられ、2024 年 1 月 21 日に年間最低気温 -10.6°C を観測した。日最高気温も秋から冬にかけて低下し 12 月から 2 月にはほとんどの日で 10°C を下回った。ただし、2024 年 2 月中旬には 10°C を超える日が数日みられた。積雪は 2023 年 12 月上旬に根雪となり、1 月中旬ごろから 4 月上旬にかけて、コルドンの高さである約 30 cm を超える積雪深が維持された (Fig. 1 B)。

ブドウ越冬芽の耐凍性はいずれの品種においても、10 月から 12 月下旬の低温馴化期において向上した (Table 2)。*‘ケルナー’*を除く 9 品種では、12 月下旬に最大の耐凍性を示したのに対し、*‘ケルナー’*では 12 月下旬から 2 月中旬にかけてさらに耐凍性が強まり、2 月中旬に LTE の最低値を示した。多くの品種において最大の耐凍性が観察された 12 月下旬において、最も耐凍性が強かったのは*‘山幸’*および*‘セイベル 13053’*であり、次いで*‘清舞’*、*‘清見’*、*‘デラウェア’*および*‘メイヴ’*の順であった。*‘ケルナー’*、*‘ピノ・ノワール’*および*‘ツヴァイゲルトレーベ’*はこれらに次ぎ、最も耐凍性が弱かったのは*‘ミュラートルガウ’*であった。

脱馴化期においても品種間で越冬芽の耐凍性の減衰開始時期に差がみられた。ブドウ属間交配品種である*‘セイベル 13053’*、*‘清舞’*、*‘清見’*、*‘デラウェア’*および*‘メイヴ’*では 3 月上旬から下旬にかけて耐凍性が減衰したのに対し、*V. vinifera* 品種はいずれも脱馴化の開始が遅く、*‘ケルナー’*、*‘ツヴァイゲルトレーベ’*および*‘ピノ・ノワール’*では 3 月下旬から、*‘ミュラートルガウ’*では 4 月上旬以降に耐凍性が減衰した。

2-1-3-2. 越冬芽の含水率および可溶性炭水化物組成の季節変動と品種間差異

ブドウ越冬芽の含水率はいずれの品種においても、11 月下旬から 12 月下旬にかけて減少した (Table 3)。その後、12 月下旬から 1 月上旬にかけて増加し、1 月中旬には再度減少した。1 月中旬から 3 月上旬までは大きな変動はみられず、ほぼ一定の値で推移した。4 月中旬には*‘ピノ・ノワール’*、*‘ミュラートルガウ’*、*‘ケルナー’*および*‘セイベル 13053’*の 4 品種において含水率が増加し、他の 6 品種では顕著な変化は認められなかった。品種間で比較すると、3 月上旬を除いて 12 月下旬から 3 月下旬までの冬季間、*‘メイヴ’*の含水率が最も低く、*V. vinifera* 品種は相対的に含水率が高い傾向を示した。脱馴化時期にあたる 3 月下旬か

ら4月中旬において、含水率の増加が最も顕著だった品種は‘セイベル 13053’であり、その増加量は約38%であった。

越冬芽のフルクトース含量は、11月下旬から1月中旬にかけて増加し、2月上旬にかけて減少した（Table 4）。さらに、2月上旬から3月上旬にかけて再び増加し、3月下旬にかけて減少した後、4月中旬までほぼ一定あるいは減少傾向を示した。品種間で比較すると、低温馴化期および脱馴化期においては‘ケルナー’で高く、厳冬期では‘メイヴ’が高い傾向を示した。

越冬芽のグルコース含量は、11月下旬から1月中旬にかけて増加し、2月上旬にかけて減少した（Table 5）。その後2月上旬から2月中旬まで同程度で推移あるいは僅かに増加（‘ミュラートルガウ’および‘デラウェア’）し、3月上旬にかけて再び増加した後、4月中旬にかけて減少した。全10回の採取日のうち5回で品種間差がみられ、特に11月下旬、12月下旬、3月上旬および4月上旬では‘メイヴ’のグルコース含量が最も高かった。

越冬芽のスクロース含量は、多くの品種において11月下旬から1月上旬にかけて増加し、1月中旬から2月上旬にかけて減少した（Table 6）。その後2月中旬にかけて再び増加し、3月上旬までほぼ一定で推移したのち、4月下旬にかけて減少した。品種間で比較すると、全採取時期を通じて‘セイベル 13053’が最も高い傾向を示し、脱馴化期においては‘清舞’でも高い値がみられた。

越冬芽のラフィノース含量は、低温馴化期から厳冬期にかけて品種ごとに異なる変動パターンを示したが、3月下旬から4月中旬にかけては全ての品種で減少した（Table 7）。品種間で比較すると、全期間を通じて‘セイベル 13053’が高く、‘ミュラートルガウ’および‘デラウェア’が低い傾向を示した。

越冬芽のスタキオース含量は、1月上旬から中旬にかけて増加し、その後3月上旬にかけて減少した（Table 8）。品種間で比較すると、全期間を通じて‘ケルナー’が最も高く、‘ミュラートルガウ’および‘デラウェア’が低い傾向を示した。

越冬芽の総可溶性炭水化物含量は、11月下旬から1月中旬にかけて増加し、2月上旬にかけて減少した後、3月上旬にかけて再び増加し、4月上旬にかけて減少した（Table 9）。品種間で比較すると、全期間を通じて‘セイベル 13053’が最も高く、‘ミュラートルガウ’が最も低い傾向を示した。

2-1-3-3. ブドウ越冬芽の耐凍性と含水率および可溶性炭水化物との関連

越冬芽の LTE と含水率および可溶性炭水化物含量との相関関係を品種毎に解析した結果 (Table 10)、含水率は、過半数の品種で LTE と正の相関を示し、特に‘セイベル 13053’で相関が最も高かった。すなわち、含水率が低いほど耐凍性が強い傾向が認められた。

可溶性炭水化物含量に関して、各組織内成分と LTE との相関の強さは品種ごとに異なるものの、ほぼ全ての項目で負の相関を示した。すなわち、可溶性炭水化物含量が多いほど耐凍性が強い傾向が認められた。フルクトースおよび総可溶性炭水化物は、‘セイベル 13053’において 5%水準で有意な相関を示した。グルコースは、他の可溶性炭水化物と比べて最も多くの品種で有意な相関を示した。すなわち、‘ミュラートルガウ’、‘ツヴァイゲルトレーベ’、‘セイベル 13053’、‘清見’、‘清舞’、‘デラウェア’が 5%水準で有意な相関を示した。スクロースは、‘セイベル 13053’および‘デラウェア’で、ラフィノースは、‘ピノ・ノワール’、‘ケルナー’および‘メイヴ’で、スタキオースは、‘ケルナー’で各々 5%水準で有意な相関を示した。

2-1-4. 考察

2-1-4-1. 越冬芽の耐凍性の季節変動および品種間差

本節の結果から、ブドウ 10 品種の越冬芽の耐凍性はいずれも、10 月から 12 月にかけての外気温の低下に伴い向上した (Fig. 1; Table 2)。ブドウ越冬芽の耐凍性が秋季の気温低下に伴って向上することは先行研究においても報告されており (Fennell, 2004; Wolf and Pool, 1987)、本研究の結果はこれらと一致した。また、本研究において、越冬芽の耐凍性は低温馴化の進行に伴い向上したが、その最大の耐凍性は品種ごとに異なった (Table 2)。供試品種のうち、‘ピノ・ノワール’、‘ミュラートルガウ’、‘ケルナー’および‘ツヴァイゲルトレーベ’は *V. vinifera* 種であり、‘セイベル 13053’および‘清見’は *V. vinifera*、*V. rupestris*、*V. labrusca*、*V. lincecumii* の交雑種であり、‘清舞’および‘山幸’は‘清見’と *V. amurensis* の交雑種であり、‘デラウェア’は *V. labrusca* と *V. aestivalis* の交雑種であり、‘メイヴ’は *V. riparia* と *V. vinifera* の交雑種である (Fisher, 1980; Manabu et al., 2025; Robinson et al., 2012; 田中・石村, 2020; Table 1)。先行研究において、*V. amurensis*、*V. riparia* および *V. labrusca* 種ならびにそれらと *V. vinifera* の交雑種は、*V. vinifera* 種と比較して冬季に強い耐凍性を示すことが報告されている (Horiuchi et al., 2021; Proebsting et al., 1980; Zhang and Dami, 2012)。本節で得られた結果も、これらの報告と一致し、ブドウ属内の遺伝的背景が越冬芽の耐凍性の最大値に大きく影響していることを示唆した。また、‘セイベル 13053’の枝変わり品種である‘清見’ (Tsumura et al., 2019) の耐凍性は、全期間を通じて‘セイベル 13053’と同程度であった。

また、同じ *V. vinifera* 品種であっても、いくつかの時期において越冬芽の耐凍性に品種間差が認められた。すなわち、‘ケルナー’は 10 月から 11 月の低温馴化期において、他の *V. vinifera* 品種よりも耐凍性が向上する時期が早く、1 月から 2 月の厳冬期において他の *V. vinifera* 品種よりも最大の耐凍性が高い傾向を示した (Table 2)。「ケルナー」は、*V. vinifera* 品種の中でも耐凍性が高いことが有名な‘リースリング’の後代 (‘スキアーヴァグロッサ’ (別名‘トロリンガー’) × ‘リースリング’) であり (Robinson et al., 2012)、「ケルナー」が示す高い耐凍性は‘リースリング’に依拠するものと考えられる。興味深いことに、「ケルナー」と同様に‘リースリング’を片親とする‘ミュラートルガウ’ (‘リースリング’ × ‘マデライン・ロイヤル’) は、「ケルナー」とは対照的に耐凍性が弱い傾向を示した。両品種は耐凍性の高い‘リースリング’を母本・父本のどちらに持つかが異なり、交配の組み合わせも異なるため、耐凍性に寄与する遺伝的要因の組み合わせが品種ごとに異なる可能性がある。すなわち、同じ *V. vinifera* 品種であっても、耐凍性関連遺伝子の発現特性の差異が越冬芽の耐凍性の違いとし

て現れると考えられる。

2-1-4-2. 越冬芽の耐凍性と含水率の関連

多くの品種において、含水率が LTE と正の相関を示したことから、越冬芽の含水率の低下が耐凍性の向上に密接に関与していることが示唆された (Table 3, 10)。一般に植物組織では、低温馴化に伴って含水率が低下し、これにより細胞内の溶質濃度、すなわち浸透濃度が上昇して、細胞内凍結の発生が抑制されることが知られている (酒井, 1982)。この効果を試算すると、含水率が 60% から 40% に減少した際、細胞内の溶質量が変化しなかった場合において、細胞内の溶質濃度は 2.25 倍に増加する。これは、後述する可溶性炭水化物の耐凍性向上効果をさらに高める一因となる。本研究において、耐凍性が向上する時期に含水率が低下したことから、低温馴化の主要な適応応答として細胞内の水分調節が働いていると考えられる。

特に‘メイヴ’や‘セイベル 13053’など冬季に含水率が低い品種で高い耐凍性が認められたことは、低水分状態が耐凍性の向上に寄与していることを示唆する。一方で、その他の多くの品種では、含水率と耐凍性との間に正の相関は認められたものの、有意ではなかった。先行研究において、低温馴化の初期段階における急速な脱水が耐凍性獲得に重要であり、この時期に含水率と耐凍性の間に強い相関関係が見られることが報告されている (Kaya and Köse, 2017)。本節では越冬芽の含水率が最も変動する低温馴化初期にデータが得られなかったことで、耐凍性と含水率との関連を捉えきれなかった可能性が考えられた。また、4 月中旬には‘セイベル 13053’以外の品種においては萌芽が開始しておらず、越冬芽の含水率の増加がみられなかったことも統計的な相関が弱まった一因として考えられる (Table 3)。

2-1-4-3. 越冬芽の耐凍性と各可溶性炭水化物含量の関連

可溶性炭水化物含量と LTE との間には多くの品種で負の相関がみられ、特にグルコースでは、採取回数が少なかった‘山幸’を除き、LTE と有意な負の相関を示した (Table 10)。グルコースをはじめとする可溶性糖類は、適合溶質として細胞内凍結温度を低下させるとともに、細胞内浸透圧の調節によって凍結脱水時に細胞内からの過度な脱水を防ぐとともに、細胞膜やタンパク質を安定化させる保護物質として機能することで、細胞内凍結に伴う細胞損傷を軽減する役割を果たすことが知られている (Sakai and Larcher, 1987)。また、本節

では 10 品種のうち 6 品種においてラフィノースでも同様の傾向がみられた。ラフィノースは細胞膜の安定化や抗酸化作用を通じて凍結障害を軽減することが報告されており (Hincha et al., 2003; Nishizawa et al., 2008)、いくつかのブドウ品種では耐凍性の高まる時期にラフィノースを蓄積し、耐凍性と高い相関を示すことが報告されている (Badulescu and Ernst, 2006; Grant et al., 2009; Hamman et al., 1996)。本研究結果はこれらの知見を支持し、低温環境下での可溶性炭水化物の蓄積がブドウ越冬芽の耐凍性向上に寄与していることを示唆している。

一方、いくつかの可溶性炭水化物は、多くの品種において耐凍性との明確な相関が認められなかった。特にスクロースは‘セイベル 13053’および‘デラウェア’の 2 品種において耐凍性との有意な相関を示したのに対し、その他の品種においては相関が認められなかった (Table 10)。*V. vinifera* 品種の越冬芽では、単糖に比べてスクロースが耐凍性に寄与する割合は小さいという報告があり (Jones et al., 1999)、本研究の結果はそれを支持している。スタキオースにおいても、今回用いた 10 品種のうち、‘ケルナー’のみで有意な相関がみられた。先行研究において、*V. vinifera* の‘リースリング’および‘シャルドネ’で耐凍性とスタキオースには強い相関が認められる (Hamman et al., 1996) 反面、*V. riparia* × *V. rupestris* の‘クーデルク 3309’では、スタキオースと耐凍性の相関が弱いことが示されている (Grant and Dami, 2015)。これらの先行研究と本節の結果を踏まえると、耐凍性向上に寄与する可溶性炭水化物の種類が品種ごとに異なる可能性が考えられる。

可溶性炭水化物などの適合溶質の蓄積は、細胞内溶液の浸透濃度の上昇を介して束一的な凝固点降下を引き起こすことが知られる (Koster and Lunch, 1992)。水のモル凝固点降下定数 (K_f) は $1.85 \text{ K}\cdot\text{kg/mol}$ であり、これは非電解質溶質が水 1 kg あたり 1 mol 増加すると、凍結温度が 1.85°C 低下することを意味する。本研究において、越冬芽における可溶性炭水化物のモル濃度は、最も低い 4 月中旬の‘ミュラートルガウ’で約 $0.1 \text{ mol/kg H}_2\text{O}$ 、最も高い 2 月中旬の‘セイベル 13053’において $0.6 \text{ mol/kg H}_2\text{O}$ であった (Fig. 3)。これらが全て組織内の水に溶解していると仮定し凝固点降下度を試算すると、それぞれ約 0.2 および 1.1°C となり、その差は 1°C 未満にとどまる。この値は、実際の観測値である両品種・時期間の LTE の差である約 7.2°C と比較して著しく小さく (Table 2)、可溶性炭水化物の蓄積による物理的な凝固点降下のみでは、越冬芽の耐凍性増大を説明できない。この点に関し、Kasuga et al (2012) は、カツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) およびクワ (*Morus bombycis*) の木部柔細胞を用いた実験において、凍結と融解を繰り返した後に 1.0 M グルコースに浸漬した場合、LTE が凍結融解のみの区と比較して 10°C 以上低下することを報告している。ここで 1.0 M グルコースによる理論的な凝固点降下度は 1.85°C であり、観測された LTE の低下量が束一的な凝固点降下度を遥かに凌駕していることから、糖の添加が単なる凝固点降下以上の効果を及ぼしていることを示唆している。同氏らはこの要因として、細胞内溶液の粘性増大

により氷核形成の阻害効果の可能性や、高濃度の糖によるガラス化の起こりやすさについて言及しており (Koster and Leopold, 1988; Rasmussen et al., 1997)、可溶性糖類が凝固点降下以上の耐凍性増大効果を持つ理由を強調している。また、ブドウ越冬芽においては、器官外凍結に伴う部分的な凍結脱水が起こることが報告されており (Kasuga et al., 2020)、原基内の可溶性炭水化物濃度がより高まることでの過冷却が促進される可能性が考えられた。

本研究では、越冬芽の可溶性炭水化物の測定を 11 月下旬以降に開始したため、低温馴化初期におけるスタキオース蓄積の動態や、その段階での耐凍性への寄与を十分に捉えられなかった可能性がある。したがって、本研究でスタキオースが多くの品種において耐凍性との相関を示さなかった理由として、測定開始時期が遅かったことが影響その可能性も否定できない。一方、‘ケルナー’では、他の品種と比べ、スタキオースが冬季を通して有意に多く蓄積されていた (Table 8)。このことは、耐凍性の向上に影響する可溶性炭水化物の種類や寄与の度合いが品種ごとに異なる可能性を示唆している。すなわち、特定の品種ではスタキオースが重要な役割を果たす一方、他の品種では別の糖類が主要な要因となっている可能性が考えられる。

Table 1. List of *Vitis* plants used for the experiments.

Species	Cultivar	Country
<i>V. vinifera</i>	Pinot noir	France
	Müller thurgau	Germany
	Zweigeltrebe	Austria
	Kerner	Germany
<i>V. vinifera</i> , <i>rupestris</i> , <i>labrusca</i> , <i>lincecumii</i>	Seibel 13053	France
	Kiyomi	Japan
<i>V. amurensis</i> × Kiyomi	Kiyomai	Japan
Kiyomi × <i>V. amurensis</i>	Yamasachi	Japan
<i>V. labrusca</i> × <i>aestivalis</i>	Delaware	USA
<i>V. vinifera</i> , <i>riparia</i>	Maeve	Japan

The parent listed on the left side of “×” is the seed parent, and the one on the right side is the pollen parent. Species names separated by a comma indicate that the pollen–seed parent relationship is unclear or that multiple crossing relationships exist in the pedigree.

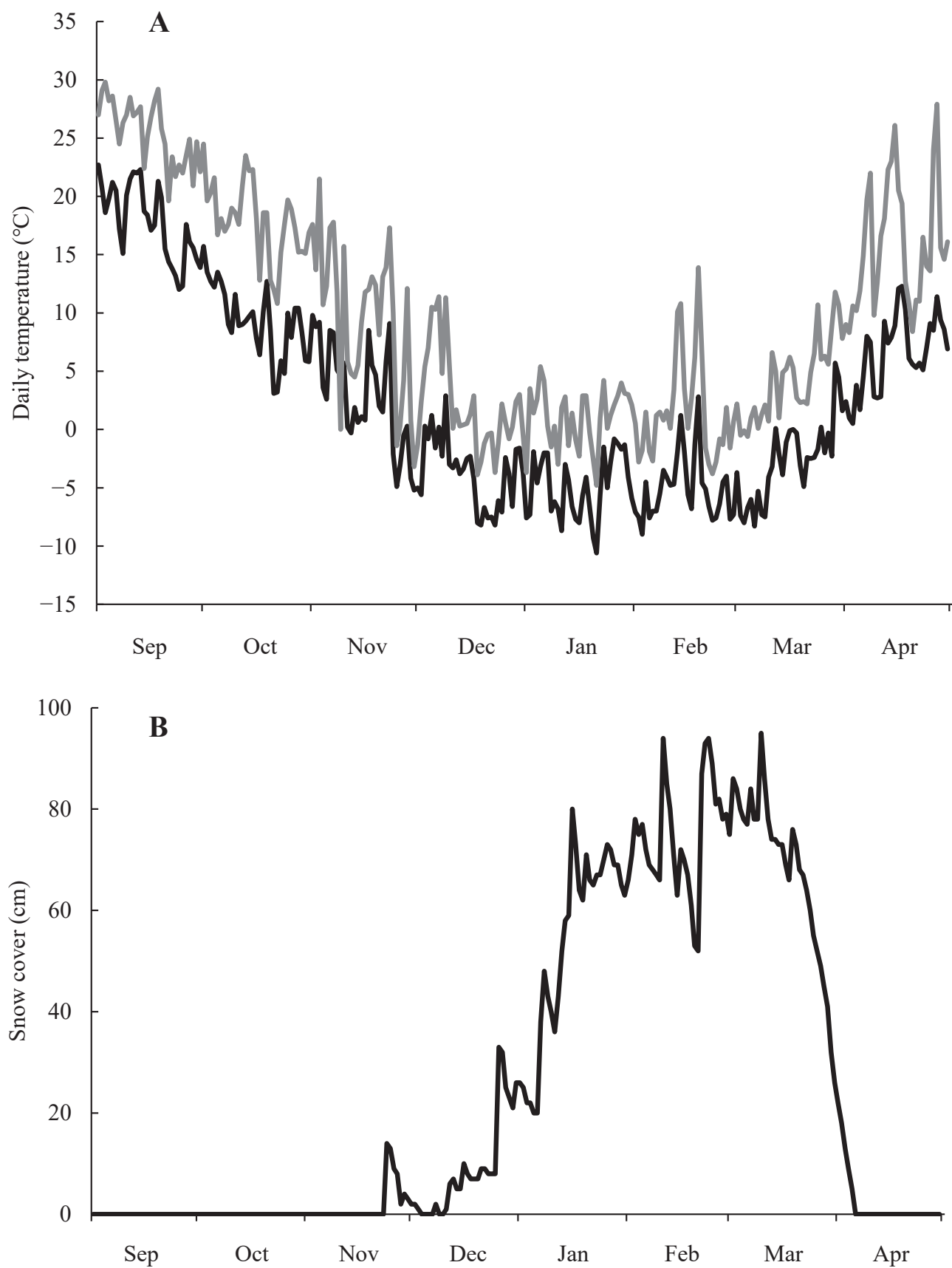


Fig. 1. (A) Change in the daily minimum (black line) and maximum (gray line) air temperature and (B) snow cover during experimental period (October 2023 to April 2024).

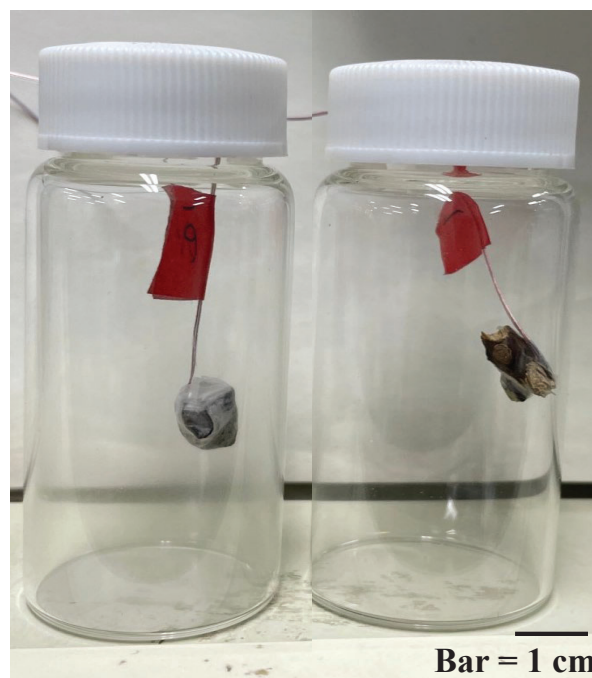
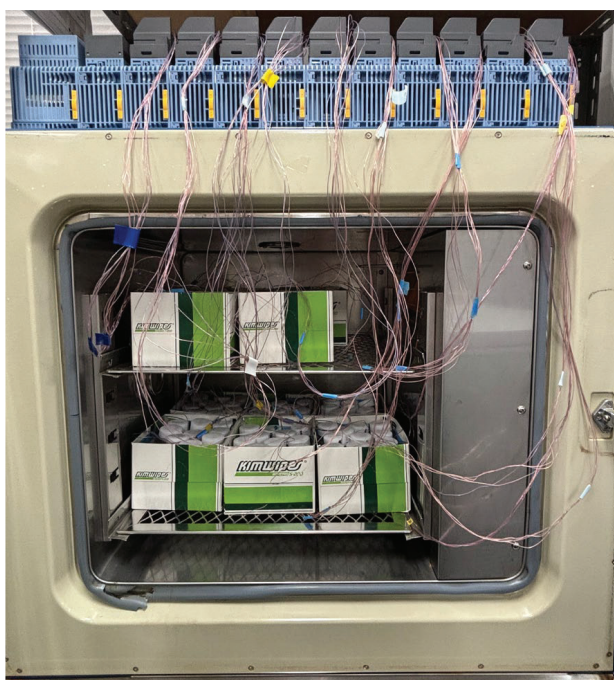
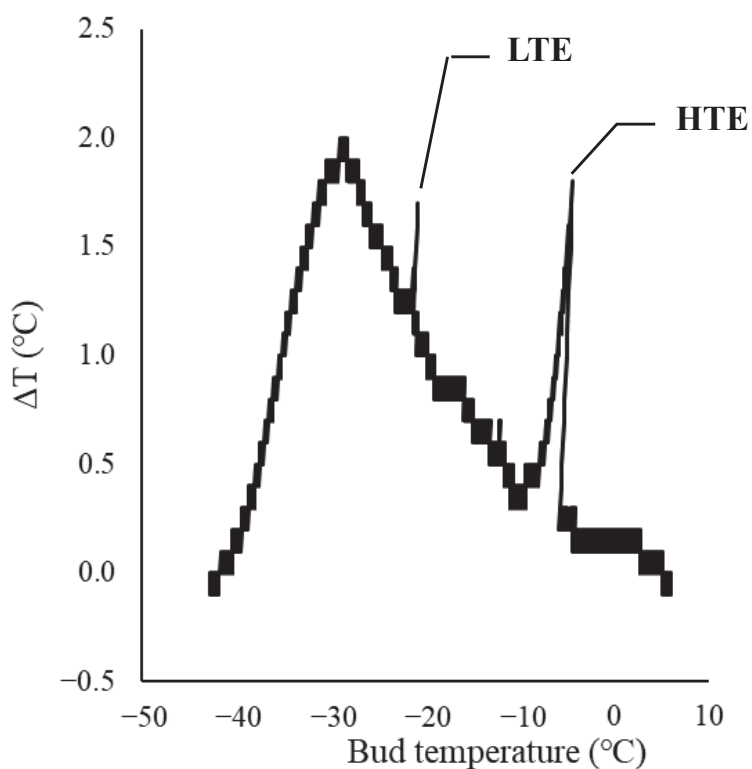
A**B****C****D**

Fig. 2. Procedures for differential thermal analysis (DTA).

- (A) A fresh cut cane with single bud (left) and a dried cane with single bud (right).
- (B) Thermocouple attached to the bud using Parafilm and placed in a 50 mL screw-cap bottle.
- (C) Cooling using a program freezer.
- (D) A typical profile of the differential thermal analysis of a grapevine bud. Two peaks indicate HTE (high temperature exotherm) and LTE (low temperature exotherm), respectively. ΔT represents difference between the temperature from the fresh and dried samples.

Table 2. Seasonal and cultivar differences in freezing resistance in buds of 10 grapevine cultivars.

Cultivar	LTE (° C)			
	2023/10/7	2023/10/28	2023/11/25	2023/12/23
Pinot noir	-6.9 ± 0.81b	-10.0 ± 0.28def	-17.6 ± 0.50ef	-23.6 ± 0.27ef
Müller thurgau	-8.7 ± 0.29ab	-12.3 ± 0.32ab	-16.6 ± 0.28f	-21.3 ± 0.25f
Kerner	-10.7 ± 0.84a	-11.7 ± 0.14abc	-21.2 ± 0.29bc	-23.8 ± 0.37e
Zweigeltrebe	-9.7 ± 1.40ab	-11.7 ± 0.27abc	-18.8 ± 0.29de	-23.3 ± 0.74ef
Seibel 13053	-9.7 ± 0.37ab	-8.7 ± 0.19fg	-23.2 ± 0.39a	-31.4 ± 1.32ab
Kiyomi	-9.1 ± 0.53ab	-13.0 ± 0.23a	-22.1 ± 0.26ab	-29.5 ± 0.45bc
Kiyomai	-10.7 ± 0.26a	-7.6 ± 0.57g	-23.3 ± 0.32a	-29.8 ± 0.38bc
Yamasachi	-8.3 ± 0.59ab	-9.7 ± 0.34ef	-21.5 ± 0.39abc	-32.7 ± 0.47a
Delaware	-8.9 ± 0.37ab	-11.5 ± 0.40bcd	-22.3 ± 0.42ab	-28.4 ± 0.77cd
Maeve	-9.8 ± 0.34ab	-10.7 ± 0.25cde	-19.8 ± 0.52cd	-26.4 ± 0.41d
Cultivar	2024/1/6	2024/1/20	2024/2/3	2024/2/17
Pinot noir	-22.9 ± 0.42de	-23.6 ± 0.38de	-23.6 ± 0.38g	-24.5 ± 0.31d
Müller thurgau	-21.4 ± 0.44e	-22.4 ± 0.26e	-22.4 ± 0.26g	-22.7 ± 0.46e
Kerner	-23.8 ± 0.14cd	-25.2 ± 0.24cd	-25.2 ± 0.24defg	-26.3 ± 0.29cd
Zweigeltrebe	-22.7 ± 0.22de	-23.9 ± 0.96de	-23.9 ± 0.96fg	-23.7 ± 0.19e
Seibel 13053	-27.4 ± 0.79ab	-31.7 ± 0.74a	-31.7 ± 0.74a	-26.9 ± 0.94abc
Kiyomi	-28.2 ± 0.24a	-29.7 ± 0.50a	-29.7 ± 0.50ab	-26.6 ± 0.30bc
Kiyomai	-27.7 ± 0.18a	-27.0 ± 0.58bc	-27.0 ± 0.58bcde	-28.5 ± 0.20a
Yamasachi	-28.2 ± 0.62a	-29.9 ± 1.12a	-30.9 ± 0.43a	-28.2 ± 0.63ab
Delaware	-27.0 ± 0.35ab	-28.6 ± 0.17ab	-28.6 ± 0.17abcd	-26.3 ± 0.49bc
Maeve	-26.9 ± 0.19ab	-26.7 ± 0.17bc	-26.7 ± 0.17cdef	-26.3 ± 0.30bcd
Cultivar	2024/3/2	2024/3/30	2024/4/6	2024/4/13
Pinot noir	-21.8 ± 0.73d	-21.4 ± 0.71bcde	-18.2 ± 0.90b	-12.0 ± 1.12abcd
Müller thurgau	-21.8 ± 0.44cd	-20.7 ± 0.77cde	-20.2 ± 0.79ab	-14.0 ± 0.62ab
Kerner	-22.6 ± 0.45cd	-22.0 ± 0.42abc	-19.5 ± 0.47ab	-15.6 ± 0.37a
Zweigeltrebe	-22.3 ± 0.43cd	-21.3 ± 0.20bcde	-17.9 ± 0.96b	-13.2 ± 0.34abcd
Seibel 13053	-26.7 ± 0.50ab	-23.0 ± 0.30abc	-19.5 ± 0.44ab	-9.6 ± 1.10d
Kiyomi	-26.9 ± 0.66ab	-20.8 ± 0.64bcde	-19.6 ± 1.20ab	-15.8 ± 0.97a
Kiyomai	-27.1 ± 0.38ab	-19.1 ± 0.40e	-21.7 ± 0.55a	-13.3 ± 0.35abcd
Yamasachi	-28.8 ± 0.82a	—	—	—
Delaware	-26.7 ± 0.49ab	-22.2 ± 0.50abc	-18.3 ± 0.31b	-15.7 ± 0.95a
Maeve	-25.5 ± 0.24b	-21.9 ± 0.22abcd	-19.1 ± 0.60ab	-11.7 ± 0.80bcd

The data represent the initiation temperature of low temperature exotherm in DTA (mean ± SE, n = 3–6). Different letters indicate significant differences among cultivars at the same sampling date (Tukey–Kramer’s test; $P < 0.05$). — ; not measured.

Table 3. Seasonal and cultivar differences in water content in buds of 10 grapevine cultivars.

Cultivar	Water content (%)				
	2023/11/25	2023/12/23	2024/1/6	2024/1/20	2024/2/3
Pinot noir	45.96 ± 0.44b	37.73 ± 1.19bc	44.80 ± 0.16bcd	38.24 ± 1.57cd	39.90 ± 0.90bc
Müller thurgau	49.84 ± 0.28a	40.24 ± 1.14ab	46.96 ± 1.62abc	43.16 ± 0.60ab	44.28 ± 0.60a
Kerner	46.64 ± 0.65ab	42.84 ± 0.49a	47.80 ± 0.36ab	41.50 ± 0.54abc	41.60 ± 0.38ab
Zweigeltrebe	41.36 ± 1.13cd	—	43.14 ± 0.53cd	40.56 ± 0.72abc	39.12 ± 1.12bcd
Seibel 13053	43.22 ± 1.01bc	40.64 ± 1.09ab	45.64 ± 0.88abcd	44.40 ± 0.23a	37.74 ± 0.52bcde
Kiyomi	39.62 ± 0.27cd	37.28 ± 0.47bc	42.28 ± 0.35d	40.66 ± 0.31abc	37.86 ± 0.25bcde
Kiyomai	42.08 ± 0.82cd	37.84 ± 0.45bc	42.34 ± 1.81cd	39.18 ± 0.30bcd	36.82 ± 0.52cde
Yamasachi	38.52 ± 0.90d	36.10 ± 0.91bc	44.32 ± 0.37bcd	38.66 ± 1.33cd	36.40 ± 0.80cde
Delaware	42.06 ± 0.87cd	36.64 ± 1.25bc	42.74 ± 0.55cd	41.18 ± 0.70abc	35.64 ± 0.85de
Maeve	43.20 ± 1.80bc	34.60 ± 1.37c	39.33 ± 0.79e	35.73 ± 1.92d	33.98 ± 0.93e

Cultivar	Water content (%)				
	2024/2/17	2024/3/2	2024/3/30	2024/4/6	2024/4/13
Pinot noir	41.58 ± 0.60ab	42.20 ± 0.31bc	42.74 ± 0.71ab	39.6 ± 0.52 c	42.76 ± 0.99cde
Müller thurgau	37.92 ± 0.53bc	47.28 ± 1.00a	40.83 ± 2.97ab	41.6 ± 1.55 abc	49.06 ± 0.56bc
Kerner	41.58 ± 0.15ab	37.72 ± 0.43d	46.66 ± 0.51a	42.9 ± 0.55 abc	49.78 ± 1.32b
Zweigeltrebe	44.32 ± 0.56a	44.34 ± 0.39ab	44.88 ± 1.17ab	41.8 ± 0.61 abc	41.60 ± 1.01de
Seibel 13053	33.88 ± 0.88c	42.46 ± 0.59bc	40.87 ± 3.99ab	44.1 ± 0.64 ab	56.76 ± 1.09a
Kiyomi	41.50 ± 0.99ab	40.80 ± 0.35c	42.72 ± 1.12ab	43.5 ± 0.40 abc	44.20 ± 1.04bcde
Kiyomai	40.48 ± 0.39ab	40.54 ± 0.43cd	42.56 ± 1.29ab	39.1 ± 1.02 c	41.74 ± 2.70de
Yamasachi	41.73 ± 4.52ab	34.36 ± 0.56e	—	—	—
Delaware	42.90 ± 1.00ab	40.32 ± 0.63cd	41.34 ± 0.97ab	45.4 ± 1.37 a	47.00 ± 0.47bcde
Maeve	38.34 ± 1.48bc	37.68 ± 1.07d	38.33 ± 2.15b	40.9 ± 0.17 bc	40.98 ± 2.88e

The data represent the water content of bud (mean ± SE, n = 5). Different letters indicate significant differences between cultivars at the same sampling date (Tukey–Kramer’s test; $P < 0.05$). — ; not measured

Table 4. Seasonal and cultivar differences in fructose content in buds of 10 grapevine cultivars.

Fructose content (mg/g DW)					
Cultivar	2023/11/25	2023/12/23	2024/1/6	2024/1/20	2024/2/3
Pinot noir	8.57 ± 0.55 bc	12.86 ± 1.42 cd	18.97 ± 0.47 ab	23.85 ± 1.44	14.25 ± 1.89 bc
Müller thurgau	7.43 ± 1.41 c	10.04 ± 0.77 d	15.99 ± 6.13 b	13.45 ± 3.05	11.87 ± 1.26 c
Kerner	14.06 ± 1.24 a	22.33 ± 1.04 ab	32.62 ± 1.35 a	31.71 ± 4.47	18.60 ± 0.68 abc
Zweigeltrebe	6.72 ± 1.04 c	— —	20.24 ± 1.62 ab	20.27 ± 5.49	14.90 ± 2.56 bc
Seibel13053	6.75 ± 0.16 c	21.52 ± 1.23 ab	29.38 ± 3.25 ab	31.29 ± 1.57 ns	22.10 ± 1.19 a
Kiyomi	6.00 ± 0.28 c	17.09 ± 0.36 ad	26.56 ± 0.58 ab	29.15 ± 1.26	15.33 ± 0.49 abc
Kiyomai	6.12 ± 0.38 c	16.63 ± 0.35 ad	23.12 ± 3.92 ab	27.34 ± 1.82	13.96 ± 0.94 bc
Yamasachi	5.69 ± 0.46 c	15.23 ± 0.37 bd	24.31 ± 3.22 ab	27.45 ± 4.20	16.81 ± 0.18 abc
Delaware	11.47 ± 0.61 ab	17.62 ± 3.15 ac	28.12 ± 1.94 ab	25.21 ± 2.92	14.41 ± 0.75 bc
Maeve	12.76 ± 0.74 a	23.69 ± 1.33 a	17.16 ± 2.93 b	28.08 ± 6.99	19.72 ± 2.22 ab

Fructose content (mg/g DW)					
Cultivar	2024/2/17	2024/3/2	2024/3/30	2024/4/6	2024/4/13
Pinot noir	18.05 ± 1.97	33.81 ± 1.92 b	13.64 ± 0.68	12.07 ± 1.13 ab	16.50 ± 1.00 ab
Müller thurgau	17.62 ± 5.02	22.89 ± 2.97 b	16.51 ± 1.79	7.44 ± 1.23 bc	6.35 ± 1.07 b
Kerner	21.43 ± 0.04	32.71 ± 1.21 bc	19.99 ± 2.32	15.11 ± 1.11 a	24.22 ± 5.99 a
Zweigeltrebe	21.25 ± 1.17	32.50 ± 1.65 bcd	16.87 ± 0.78	12.54 ± 2.18 ab	7.59 ± 0.76 b
Seibel13053	20.31 ± 0.43 ns	33.64 ± 3.47 b	18.95 ± 5.66 ns	6.53 ± 1.15 bc	12.59 ± 1.24 ab
Kiyomi	18.03 ± 4.45	23.47 ± 0.99 bd	12.04 ± 6.43	8.53 ± 0.31 abc	16.03 ± 6.16 ab
Kiyomai	15.52 ± 2.33	25.41 ± 1.65 bcd	11.14 ± 1.51	4.70 ± 0.63 c	10.74 ± 4.45 ab
Yamasachi	19.10 ± 3.86	24.49 ± 0.96 bcd	— —	— —	— —
Delaware	21.52 ± 2.17	29.58 ± 0.62 bcd	10.65 ± 0.84	12.36 ± 1.62 ab	16.89 ± 0.69 ab
Maeve	17.12 ± 0.54	48.35 ± 2.07 a	18.16 ± 0.98	14.55 ± 2.21 a	17.61 ± 3.80 ab

The data represent the water content of bud (mean ± SE, n = 5). Different letters indicate significant differences between cultivars at the same sampling date (Tukey–Kramer’s test; $P < 0.05$). — ; not measured

Table 5. Seasonal and cultivar differences in glucose content in buds of 10 grapevine cultivars.

Glucose content (mg/g DW)					
Cultivar	2023/11/25	2023/12/23	2024/1/6	2024/1/20	2024/2/3
Pinot noir	9.88 ± 0.68 bc	13.64 ± 1.37 cd	23.70 ± 0.62 ab	26.34 ± 2.10	12.53 ± 3.28
Müller thurgau	8.63 ± 1.86 c	11.29 ± 1.10 d	19.82 ± 7.22 ab	15.03 ± 3.36	9.34 ± 0.96
Kerner	16.46 ± 1.57 a	21.08 ± 1.13 ab	37.77 ± 1.56 a	32.02 ± 5.01	12.63 ± 0.63
Zweigeltrebe	7.83 ± 1.32 c	— —	25.75 ± 1.92 ab	22.22 ± 6.02	12.79 ± 2.25
Seibel13053	7.67 ± 0.39 c	22.72 ± 0.66 ab	37.11 ± 3.71 a	31.50 ± 1.59	17.25 ± 0.30
Kiyomi	7.06 ± 0.47 c	19.00 ± 0.87 abc	35.82 ± 0.87 ab	33.10 ± 0.93 ns	12.87 ± 0.63 ns
Kiyomai	7.44 ± 0.50 c	18.72 ± 0.62 abc	33.28 ± 5.60 ab	29.88 ± 1.45	13.42 ± 1.01
Yamasachi	6.72 ± 0.59 c	16.67 ± 0.60 bcd	31.15 ± 4.58 ab	30.24 ± 4.73	13.02 ± 0.79
Delaware	13.97 ± 0.58 ab	18.75 ± 3.33 abc	34.37 ± 1.16 ab	26.04 ± 4.27	11.21 ± 0.69
Maeve	15.26 ± 0.95 a	25.42 ± 0.85 a	18.05 ± 3.71 b	31.27 ± 7.92	16.80 ± 2.48

Glucose content (mg/g DW)					
Cultivar	2024/2/17	2024/3/2	2024/3/30	2024/4/6	2024/4/13
Pinot noir	13.35 ± 1.52	28.32 ± 1.79 ab	15.77 ± 0.98	6.14 ± 0.84 ab	4.39 ± 3.05
Müller thurgau	16.77 ± 6.26	19.01 ± 3.28 bc	17.78 ± 2.52	5.00 ± 0.88 ab	2.13 ± 0.90
Kerner	13.86 ± 0.33	19.73 ± 0.69 bc	23.35 ± 3.01	6.14 ± 0.53 ab	1.87 ± 0.88
Zweigeltrebe	17.01 ± 1.22	26.94 ± 1.16 b	24.52 ± 1.71	6.29 ± 1.35 ab	2.00 ± 1.36
Seibel13053	14.51 ± 0.02	23.83 ± 2.93 bc	24.69 ± 6.27	5.78 ± 1.16 ab	1.53 ± 0.17
Kiyomi	13.13 ± 4.23 ns	14.77 ± 1.10 c	18.31 ± 7.99 ns	7.93 ± 0.39 ab	1.57 ± 0.73 ns
Kiyomai	11.71 ± 1.38	21.16 ± 2.28 bc	19.27 ± 2.07	3.00 ± 0.82 b	1.17 ± 0.38
Yamasachi	14.49 ± 2.77	17.54 ± 0.78 c	— —	— —	— —
Delaware	15.39 ± 1.58	20.78 ± 0.59 bc	15.27 ± 1.12	8.55 ± 1.24 a	3.33 ± 0.88
Maeve	11.92 ± 0.37	37.41 ± 1.74 a	20.53 ± 1.74	8.57 ± 1.73 a	2.60 ± 0.87

The data represent the water content of bud (mean ± SE, n = 5). Different letters indicate significant differences between cultivars at the same sampling date (Tukey–Kramer’s test; $P < 0.05$). — ; not measured

Table 6. Seasonal and cultivar differences in sucrose content in buds of 10 grapevine cultivars.

Sucrose content (mg/g DW)										
Cultivar	2023/11/25		2023/12/23		2024/1/6		2024/1/20		2024/2/3	
Pinot noir	17.42	± 3.08 bc	13.88	± 2.00 bd	22.46	± 0.94 de	30.50	± 0.67 c	20.26	± 5.65 bd
Müller thurgau	8.72	± 1.88 c	7.38	± 0.99 e	17.95	± 5.10 de	16.91	± 2.02 c	12.05	± 0.76 cd
Kerner	24.22	± 2.04 ab	19.78	± 1.92 cd	37.38	± 1.76 be	33.46	± 8.73 bc	15.45	± 0.83 cd
Zweigeltrebe	19.35	± 2.85 bc	–	–	25.04	± 3.01 ce	27.99	± 6.61 c	14.79	± 1.42 cd
Seibel13053	33.01	± 3.39 a	41.27	± 1.95 a	57.97	± 7.45 a	62.55	± 4.10 ab	31.20	± 1.27 a
Kiyomi	17.58	± 0.99 bc	28.34	± 2.17 ac	45.03	± 1.16 abc	45.72	± 1.62 ac	20.67	± 0.89 bd
Kiyomai	25.36	± 3.15 ab	31.05	± 1.17 b	44.09	± 4.47 ae	40.61	± 2.96 ac	20.74	± 2.10 bd
Yamasachi	16.96	± 1.03 bc	33.06	± 3.13 ac	53.21	± 6.54 ab	67.09	± 12.58 a	26.92	± 0.33 ab
Delaware	11.85	± 2.14 c	19.98	± 2.27 cd	29.54	± 0.46 ce	31.86	± 5.40 c	14.34	± 2.05 cd
Maeve	8.10	± 2.11 c	13.95	± 0.11 bd	15.77	± 1.76 e	19.91	± 4.92 c	8.46	± 1.00 d

Sucrose content (mg/g DW)										
Cultivar	2024/2/17		2024/3/2		2024/3/30		2024/4/6		2024/4/13	
Pinot noir	25.33	± 4.40	22.69	± 1.61 bd	24.57	± 3.86	18.54	± 2.12 ac	15.53	± 0.25 ab
Müller thurgau	31.94	± 15.89	23.10	± 6.45 bd	14.64	± 1.95	7.96	± 0.69 c	13.11	± 2.55 b
Kerner	34.85	± 1.71	35.70	± 3.32 ad	27.06	± 3.49	20.49	± 1.07 ac	23.85	± 3.79 ab
Zweigeltrebe	26.46	± 3.23	20.34	± 1.33 c	33.10	± 4.17	19.48	± 3.13 ac	18.04	± 3.72 ab
Seibel13053	36.86	± 2.10	28.87	± 3.06 ad	33.68	± 5.36	20.62	± 1.42 ac	14.57	± 0.47 ab
Kiyomi	27.09	± 4.92 ns	41.25	± 1.55 a	37.85	± 22.84 ns	11.71	± 1.38 bc	21.63	± 4.11 ab
Kiyomai	30.89	± 8.17	32.38	± 1.77 ad	18.49	± 1.35	26.75	± 3.04 a	35.30	± 9.39 a
Yamasachi	33.86	± 10.65	39.96	± 2.84 ac	–	–	–	–	–	–
Delaware	27.90	± 1.86	25.92	± 0.83 bd	18.65	± 1.43	12.19	± 1.10 bc	13.87	± 2.30 b
Maeve	15.79	± 1.91	24.17	± 1.10 bd	26.49	± 5.25	13.55	± 1.40 bc	13.44	± 4.19 b

The data represent the water content of bud (mean ± SE, n = 5). Different letters indicate significant differences between cultivars at the same sampling date (Tukey–Kramer’s test; $P < 0.05$). – ; not measured

Table 7. Seasonal and cultivar differences in raffinose content in buds of 10 grapevine cultivars.

Cultivar	Raffinose content (mg/g DW)					
	2023/11/25	2023/12/23	2024/1/6	2024/1/20	2024/2/3	
Pinot noir	3.13 ± 0.44 ab	2.34 ± 0.20 bd	2.48 ± 0.13 ab	4.32 ± 0.16 abc	3.47 ± 1.15 a	
Müller thurgau	1.22 ± 0.26 c	1.00 ± 0.11 d	2.45 ± 0.95 ab	1.30 ± 0.06 c	0.91 ± 0.17 b	
Kerner	2.58 ± 0.12 ab	3.18 ± 0.25 bc	3.38 ± 0.17 ab	3.77 ± 0.69 abc	1.85 ± 0.11 ab	
Zweigeltrebe	2.13 ± 0.30 bc	–	3.27 ± 0.51 ab	4.20 ± 0.65 abc	1.78 ± 0.56 ab	
Seibel13053	4.19 ± 0.50 a	4.52 ± 0.51 a	5.13 ± 0.78 a	5.14 ± 0.29 ab	2.77 ± 0.18 ab	
Kiyomi	2.69 ± 0.11 ab	2.43 ± 0.13 bd	2.75 ± 0.29 ab	4.14 ± 0.34 abc	1.88 ± 0.24 ab	
Kiyomai	2.61 ± 0.16 ab	2.95 ± 0.07 bc	3.33 ± 0.48 ab	3.28 ± 0.21 abc	1.91 ± 0.14 ab	
Yamasachi	2.05 ± 0.05 bc	3.23 ± 0.54 ab	3.41 ± 0.77 ab	5.58 ± 1.17 a	2.03 ± 0.06 ab	
Delaware	1.77 ± 0.37 bc	1.60 ± 0.22 cd	2.33 ± 0.36 b	1.79 ± 0.54 bc	1.06 ± 0.27 b	
Maeve	1.81 ± 0.30 bc	2.82 ± 0.29 bd	2.70 ± 0.31 ab	4.64 ± 1.43 abc	1.75 ± 0.33 ab	

Cultivar	Raffinose content (mg/g DW)					
	2024/2/17	2024/3/2	2024/3/30	2024/4/6	2024/4/13	
Pinot noir	2.80 ± 0.63 ab	3.23 ± 0.06 a	2.01 ± 0.34 ab	1.13 ± 0.26	0.98 ± 0.08 ab	
Müller thurgau	1.83 ± 0.51 ab	1.88 ± 0.29 ce	1.24 ± 0.38 ab	0.53 ± 0.06	0.39 ± 0.04 b	
Kerner	3.35 ± 0.02 a	3.08 ± 0.36 bc	1.58 ± 0.14 ab	1.18 ± 0.16	1.16 ± 0.21 ab	
Zweigeltrebe	2.70 ± 0.27 ab	2.67 ± 0.20 be	4.52 ± 0.27 a	1.60 ± 0.11	0.99 ± 0.04 ab	
Seibel13053	3.01 ± 0.20 ab	1.53 ± 0.21 be	3.23 ± 1.02 ab	1.79 ± 0.62	0.54 ± 0.06 b	
Kiyomi	1.77 ± 0.49 ab	2.37 ± 0.23 ae	2.85 ± 1.71 ab	0.83 ± 0.14 ns	0.62 ± 0.19 b	
Kiyomai	1.79 ± 0.32 ab	1.99 ± 0.22 ce	1.27 ± 0.19 ab	1.51 ± 0.15	1.98 ± 0.69 a	
Yamasachi	2.30 ± 0.56 ab	2.51 ± 0.20 be	–	–	–	
Delaware	1.29 ± 0.20 b	1.34 ± 0.17 e	0.71 ± 0.09 b	0.76 ± 0.05	0.44 ± 0.13 b	
Maeve	2.72 ± 0.42 ab	3.09 ± 0.10 bc	2.52 ± 0.81 ab	1.20 ± 0.24	1.07 ± 0.25 ab	

The data represent the water content of bud (mean ± SE, n = 5). Different letters indicate significant differences between cultivars at the same sampling date (Tukey–Kramer’s test; $P < 0.05$). – ; not measured

Table 8. Seasonal and cultivar differences in stachyose content in buds of 10 grapevine cultivars.

Cultivar	Stachyose content (mg/g DW)					
	2023/11/25	2023/12/23	2024/1/6	2024/1/20	2024/2/3	
Pinot noir	3.90 ± 0.47 ac	3.70 ± 0.17 ab	1.87 ± 0.28 b	5.59 ± 0.46 ab	5.54 ± 2.18	
Müller thurgau	1.49 ± 0.44 e	1.41 ± 0.15 d	1.67 ± 0.72 b	1.57 ± 0.34 c	1.64 ± 0.24	
Kerner	5.54 ± 0.20 ab	5.30 ± 0.28 a	4.51 ± 0.32 a	7.61 ± 0.61 a	4.48 ± 0.17	
Zweigeltrebe	3.60 ± 0.61 ae	— —	1.62 ± 0.28 b	3.84 ± 0.71 bc	2.01 ± 0.87	
Seibel13053	4.59 ± 0.28 ad	4.19 ± 0.15 ad	1.87 ± 0.51 b	4.04 ± 0.23 bc	2.81 ± 0.17	
Kiyomi	3.80 ± 0.22 ad	2.93 ± 0.22 ad	1.82 ± 0.14 b	2.85 ± 0.14 bc	1.92 ± 0.48 ns	
Kiyomai	6.26 ± 0.70 a	3.03 ± 0.20 ab	4.02 ± 0.63 a	3.18 ± 0.34 bc	3.72 ± 0.44	
Yamasachi	2.01 ± 0.08 de	2.92 ± 0.43 ab	0.93 ± 0.30 b	3.53 ± 0.71 bc	1.92 ± 0.13	
Delaware	2.79 ± 0.52 ce	2.76 ± 0.33 cd	1.27 ± 0.26 b	2.29 ± 0.72 bc	1.74 ± 0.49	
Maeve	2.38 ± 0.50 ce	4.15 ± 0.32 ab	1.44 ± 0.29 b	5.65 ± 1.59 ab	2.45 ± 0.66	

Cultivar	Stachyose content (mg/g DW)					
	2024/2/17	2024/3/2	2024/3/30	2024/4/6	2024/4/13	
Pinot noir	2.70 ± 0.53 bc	1.65 ± 0.09 bd	2.29 ± 0.40 ab	0.94 ± 0.24 ab	2.93 ± 1.54 ab	
Müller thurgau	1.60 ± 0.32 bc	0.86 ± 0.08 cd	0.80 ± 0.29 ab	0.62 ± 0.09 ab	2.17 ± 0.54 ab	
Kerner	4.84 ± 0.61 a	2.37 ± 0.23 a	2.39 ± 0.53 ab	2.76 ± 0.63 a	0.54 ± 0.20 b	
Zweigeltrebe	2.06 ± 0.20 ac	1.31 ± 0.26 ad	2.97 ± 0.27 a	0.94 ± 0.11 ab	5.27 ± 1.58 a	
Seibel13053	2.14 ± 0.13 bc	0.72 ± 0.12 d	1.72 ± 0.36 ab	1.79 ± 0.92 ab	0.68 ± 0.04 b	
Kiyomi	1.67 ± 0.45 bc	0.81 ± 0.04 cd	1.39 ± 0.65 ab	0.48 ± 0.09 b	1.21 ± 0.47 b	
Kiyomai	1.27 ± 0.14 bc	1.29 ± 0.38 ac	1.40 ± 0.54 ab	2.08 ± 0.57 ab	0.95 ± 0.11 b	
Yamasachi	0.99 ± 0.31 a	0.88 ± 0.06 cd	— —	— —	— —	
Delaware	0.92 ± 0.19 c	0.70 ± 0.11 d	0.56 ± 0.16 b	1.33 ± 0.30 ab	0.53 ± 0.10 b	
Maeve	2.42 ± 0.18 bc	2.20 ± 0.10 ab	2.12 ± 0.61 ab	1.02 ± 0.22 ab	2.26 ± 0.19 ab	

The data represent the water content of bud (mean ± SE, n = 5). Different letters indicate significant differences between cultivars at the same sampling date (Tukey–Kramer’s test; $P < 0.05$). — ; not measured

Table 9. Seasonal and cultivar differences in TSC in buds of 10 grapevine cultivars.

TSC content (mg/g DW)										
Cultivar	2023/11/25		2023/12/23		2024/1/6		2024/1/20		2024/2/3	
Pinot noir	42.89	± 3.77 bd	46.42	± 4.09 de	69.48	± 1.48 cd	90.60	± 4.32 ab	56.05	± 14.08 ab
Müller thurgau	27.49	± 5.15 c	31.13	± 2.93 e	57.88	± 20.03 bd	48.26	± 8.56 b	35.81	± 3.24 b
Kerner	62.85	± 0.73 a	71.68	± 3.30 bc	115.66	± 3.44 ac	108.57	± 19.09 ab	53.01	± 1.81 ab
Zweigelt rebe	39.62	± 5.33 bd	—	—	75.93	± 6.23 bd	78.53	± 19.42 ab	46.26	± 7.64 ab
Seibel13053	56.21	± 3.62 ac	94.21	± 2.81 a	131.46	± 14.67 a	134.53	± 5.61 a	76.12	± 2.82 a
Kiyomi	37.11	± 0.81 bd	69.79	± 3.68 ab	111.98	± 1.54 ac	114.96	± 3.21 ab	52.66	± 2.69 ab
Kiyomai	47.80	± 3.41 ad	72.37	± 2.32 bc	107.83	± 14.93 ad	104.28	± 6.50 ab	53.74	± 4.39 ab
Yamasachi	33.43	± 1.43 bc	71.10	± 4.65 bc	113.01	± 15.15 ac	133.88	± 23.01 a	60.70	± 0.76 ab
Delaware	41.84	± 3.59 bd	60.71	± 9.13 abc	95.64	± 2.68 ad	87.19	± 13.67 ab	42.75	± 3.65 b
Maeve	40.31	± 4.51 bd	70.04	± 2.84 b	55.11	± 7.83 d	89.56	± 22.82 ab	49.18	± 6.67 ab

TSC content (mg/g DW)										
Cultivar	2024/2/17		2024/3/2		2024/3/30		2024/4/6		2024/4/13	
Pinot noir	62.24	± 8.99	89.70	± 5.21 ab	58.27	± 6.25	38.82	± 4.49 ab	40.33	± 2.62 ab
Müller thurgau	69.76	± 27.83	67.74	± 12.96 b	30.97	± 6.80	21.55	± 2.79 b	24.15	± 1.35 b
Kerner	78.33	± 2.42	93.58	± 3.84 ab	74.38	± 9.31	45.67	± 3.02 a	51.63	± 8.00 a
Zweigelt rebe	69.47	± 5.97	83.75	± 4.11 b	81.98	± 6.77	40.85	± 6.67 ab	33.89	± 2.26 ab
Seibel13053	76.83	± 1.96	88.59	± 8.59 ab	82.26	± 10.36	36.51	± 2.70 ab	29.91	± 1.80 ab
Kiyomi	61.69	± 12.66 ns	82.66	± 0.61 b	72.44	± 39.47 ns	29.49	± 1.88 ab	41.06	± 9.68 ab
Kiyomai	61.18	± 12.15	82.24	± 4.28 b	51.59	± 5.31	38.04	± 3.37 ab	50.14	± 5.88 ab
Yamasachi	70.74	± 16.62	85.38	± 4.78 ab	—	—	—	—	—	—
Delaware	67.02	± 5.42	78.34	± 1.95 b	45.85	± 3.08	35.20	± 2.09 ab	35.06	± 2.98 ab
Maeve	49.98	± 2.89	115.22	± 4.50 a	69.82	± 8.70	38.89	± 5.57 ab	36.97	± 7.71 ab

The data represent the water content of bud (mean ± SE, n = 5). Different letters indicate significant differences between cultivars at the same sampling date (Tukey–Kramer’s test; $P < 0.05$). — ; not measured

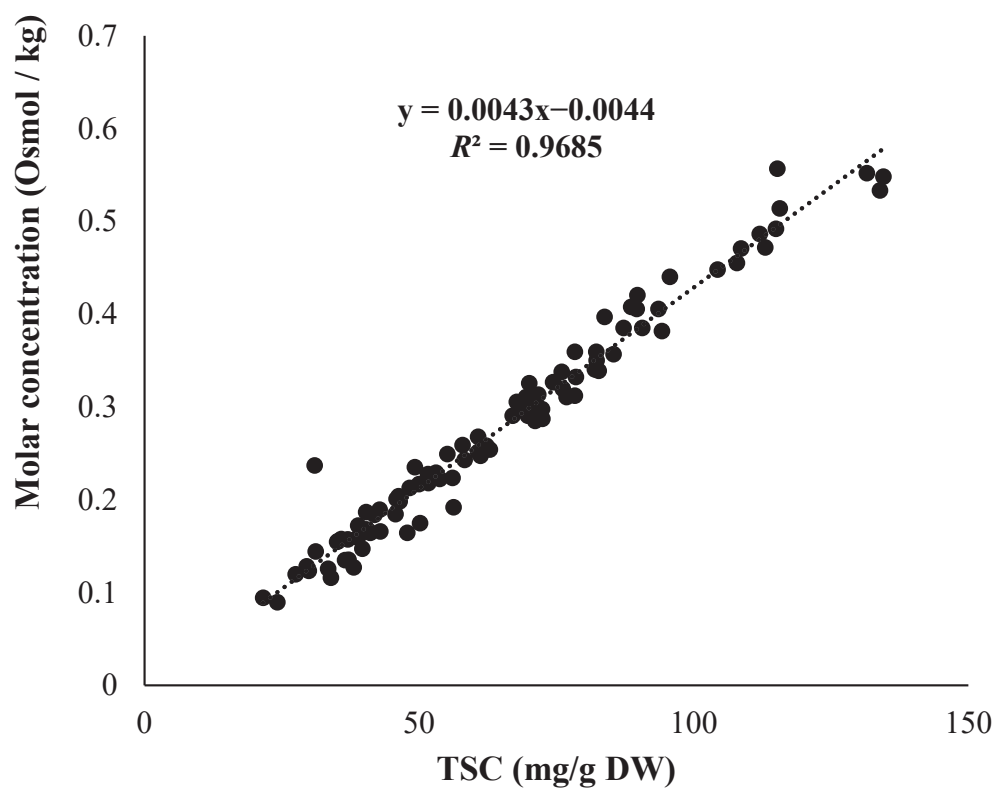


Fig. 3. The relationship between TSC and molar concentration, in grapevine buds.

Table 10. Pearson correlation coefficients between LTE, water content and soluble carbohydrate content in grapevine buds.

Cultivar	Pinot noir	Müller thurgau	Kerner	Zweigelt rebe	Seibel 13053	Kiyomi	Kiyomai	Yamasachi	Delaware	Maeve
WC	ns	†	†	ns	**	†	ns	ns	*	*
Fructose	ns	†	ns	†	*	ns	†	ns	ns	ns
Glucose	†	*	†	*	*	*	*	ns	*	†
Sucrose	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns
Raffinose	*	†	*	ns	†	†	ns	ns	ns	*
Stachyose	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TSC	†	†	ns	†	*	†	ns	ns	†	ns



**, *, and † represent significant differences at the 1%, 5%, and 10% levels, respectively (Pearson’s correlation analysis, n = 7–10). ns, not significant. TSC: total soluble carbohydrates

第2節 越冬芽および当年生枝における耐凍性と含水率、可溶性炭水化物、プロリンお

よび総ポリフェノール含量との関連性

2-2-1. 緒言

前節の緒言で述べた通り、ブドウ樹体の越冬には特に越冬芽の生存が特に重要である。一方で、春季に芽へ水分や養分を供給する通道組織として機能する当年生枝の生存も、萌芽およびその後の生育に重要である (Xie et al., 2018)。当年生枝の師部は春季の糖輸送に重要な役割を果たしており、凍結傷害によって師部が損傷すると、萌芽や新梢成長の遅れが起こることが報告されている (Antivilo et al., 2020)。

また、ブドウ越冬芽および当年生枝の耐凍性の向上には、含水率および可溶性炭水化物が重要な役割を果たすことは、前節および先行研究で述べられている通りである (Jones et al., 1999; Ershadi et al., 2016)。近年では、それらに加えて様々な組織内成分の関与が示唆されている。中でも、適合溶質としてはたらくプロリン (Ershadi et al., 2016; Karimi, 2020) および、抗酸化作用を有し細胞の酸化ストレスを軽減するフェノール化合物 (Karimi, 2017, 2020) がブドウ越冬芽および当年生枝の耐凍性向上に重要な役割を果たす可能性が指摘されている。そこで本節では、ブドウ越冬芽および当年生枝の両方を対象として、耐凍性とこれらの組織内成分の関連、ならびにその季節変動、品種間差および器官間差について明らかにすることを目的とした。なお、本節の内容は、著者らによって *Plant Stress* 誌に掲載された論文 (Kita et al., 2024) に基づいている。

2-2-2. 材料および方法

2-2-2-1. 植物材料

前節と同様に、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター実験農場（北海道札幌市）に植栽された、5 年生の *V. vinifera* の 2 品種‘ピノ・ノワール’、‘ケルナー’および *Vitis* 属の雑種‘メイヴ’を供試した。試料の採取は、2022 年 10 月 1 日、10 月 15 日、10 月 31 日、12 月 15 日、2023 年 2 月 15 日および 3 月 31 日の合計 6 回行った。当年生枝の下部から越冬芽を 2 個残し、その上部 15 節分を採取した。採取した当年生枝は、乾燥を防ぐため現地でチャック付きのポリエチレン袋に密封し、氷を入れた発泡スチロールの箱に入れて速やかに実験室に運んだ。カッターで越冬芽を切り出し、着生位置を区別せずランダムに耐凍性評価と成分分析に供試した。当年生枝については節間部分を試料として用いた。

2-2-2-2. 気象データ

前節と同様に、農研機構メッシュ農業気象データシステムを用いて実験圃場における日最高気温、日最低気温および積雪量のデータを取得した。

2-2-2-3. 耐凍性試験

越冬芽と当年生枝の耐凍性は、植物の耐凍性を簡便に評価できる電解質漏出法により測定した（Fujikawa and Miura, 1986; Horiuchi et al., 2021）。この方法は、凍結ストレスによって細胞から細胞外へ漏出する電解質量を測定することで、組織の致死温度を推定するものである。すなわち、電解質の漏出量が多いほど（試料を浸漬している溶液の導電率が高いほど）、細胞の損傷が大きく、生存率が低いことを示す。実験では、5 mL 容クライオチューブに越冬芽 3 個または長さ約 5 mm の枝切片 3 個を入れ、プログラムフリーザー（Mini-Subzero MC-710、エスベック）を用いて、 -3°C で 0.5 時間平衡化した後、細氷を試料に振りかけて植氷処理を行った。その後、試料を -5°C から -60°C まで 5°C/h の速度で冷却し、目的温度に達した後 0.5 時間平衡化した。冷却処理後、試料をプログラムフリーザーから取り出し、 4°C で 60 分間以上かけて緩やかに解凍した。解凍後の各試料に 4 mL の蒸留脱イオン水を加え、100 rpm で 4 時間静かに振とうしたのち、導電率計（B-173; 堀場製作所、日本）を用いて電気伝導度を測定した（1st C）。測定後、測定に用いた溶液を回収して元のチューブに戻し、

100℃の沸騰水中で10分間加熱した。室温で1時間冷却後、再び1時間振とうし、2回目の電気伝導度測定を行った（2nd C）。冷却処理を行った試料に加え、冷却しない対照試料（A：生存率100%）および液体窒素で急冷と解凍を3回繰り返した完全損傷試料（B：生存率0%）を用意した。両試料についても同様に、蒸留水浸漬後（1st A および 1st B）ならびに煮沸後（2nd A および 2nd B）の電気伝導度を測定した。それぞれの電気伝導度の値から、以下の式により生存率を算出した：

$$\text{生存率 (\%)} = \left(1 - \frac{\frac{1st\ C}{2nd\ C} - \frac{1st\ A}{2nd\ A}}{\frac{1st\ B}{2nd\ B} - \frac{1st\ A}{2nd\ A}} \right) \times 100$$

これらの生存率をもとに生存曲線を描き、組織細胞の50%が生存する温度である半致死温度（LT₅₀）値を求め、耐凍性の指標とした。LT₅₀が低いほど耐凍性が高いことを示す。

2-2-2-4. 含水率測定

含水率は前節と同様の方法で測定した。乾燥した越冬芽は乳鉢と乳棒を用い、当年生枝は回転式粉砕機（WB-1；大阪ケミカル株式会社、日本）をそれぞれ用いて粉末状にし、後述の可溶性炭水化物定量分析に供試した。

2-2-2-5. 可溶性炭水化物の定量分析

可溶性炭水化物の定量分析は、前節と異なり、高速液体クロマトグラフィー示差屈折率検出器（HPLC-RID）を用いて行った。すなわち、0.01 mg 単位の電子天秤を用いて秤量した粉末状にした越冬芽または当年生枝の乾物重 40 mg に 1,000 μL の 80%（v/v）エタノールおよび内部標準物質として 500 μL の 20 mM ラクトース水溶液を加え、70℃のドライバスで30分間抽出した。抽出後、14,000×g、10分間遠心分離し、得られた上清を遠心エバポレーターを用いてエタノールを除去して濃縮した。濃縮液を 14,000×g、10分間遠心分離し、上清を HPLC に供試した。

HPLC の条件は先行研究の方法に従って行った（Horikawa et al., 2019）。すなわち、移動相：75%（v/v）アセトニトリル（アイソクラティック）；ポンプ（L-6200；日立、日本）；カラム Asahipak NH2P-50 4E（4.6×250 mm、粒子径 5 μm、Shodex）；検出器：示差屈折率検出器（RID）（L-3300；日立）；カラム温度：30℃（CTO-20A；島津製作所）；流速：0.7 mL/min；注入量：10 μL。各可溶性炭水化物含量は乾物 1 g あたりの量として表した。

2-2-2-6. プロリンの定量分析

プロリンは先行研究の方法に従って定量した (Lee et al., 2018)。すなわち、0.01 mg 単位の電子天秤を用いて秤量した、凍結乾燥後粉末にした越冬芽または当年生枝 50 mg に 1% (w/v) スルホサリチル酸 1,000 μ L を加え、ボルテックスミキサーを用いて 15 秒間激しく振とうすることで抽出した。次に、80% (v/v) 酢酸に溶解したニンヒドリン試薬 130 μ L を 96 穴マイクロプレートの分析用区画にあるウェルに加えた。次に、12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離して得た上清 65 μ L を各ウェルに加えた。マイクロプレートを 100 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした後、氷浴で 10 分間冷却した。室温に戻したあと、510 nm の吸光度を測定した。検量線の作成には L-プロリンを用いた。プロリン含量は乾物 1 g 換算で表した。

2-2-2-7. 総ポリフェノールの定量分析

総ポリフェノール含量は先行研究の方法に従って定量した (Kupina et al., 2018)。すなわち、凍結乾燥後粉末にし 0.01 mg 単位の電子天秤を用いて秤量した越冬芽または当年生枝 10 mg を 80% (v/v) メタノール 1,000 μ L で室温 (約 25 $^{\circ}$ C) で 3 時間振とう抽出した。12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10 分間の遠心分離で得られた上清を、80% (v/v) メタノールで 3 倍希釈した。希釈したサンプル 15 μ L を、あらかじめ 150 μ L の水で満たした 96 穴マイクロプレートに加えた。その後、水で 6 倍希釈したフェノール試薬を 90 μ L 加え、6 分後に 20% (w/v) 炭酸ナトリウム水溶液を 45 μ L 加えた。25 $^{\circ}$ C の暗所で 2 時間反応させ、765 nm における吸光度を測定した。検量線の作成には没食子酸を用いた。総ポリフェノール含量は乾物 1 g あたりの没食子酸当量 (mg GAE/g DW) で算出した。

2-2-2-8. 統計解析

耐凍性、含水率、各可溶性炭水化物、プロリンおよび総ポリフェノール含量について、2-1-2-6. と同様の方法で統計解析を行った。

2-2-3. 結果

2-2-3-1. 越冬芽および当年生枝の耐凍性の季節変動と品種間差異

実験期間中の圃場における日最低気温は、2022 年 11 月 30 日に初めて氷点下となり、その後 2023 年 3 月上旬まで氷点下で推移した (Fig. 4 A)。年最低気温は 2023 年 1 月 30 日に観測された -13.2°C であった。積雪深は 2023 年 1 月 8 日にコルドンの高さ (約 30cm) を超え、3 月 12 日までコルドンを完全に覆っていた (Fig. 4 B)。

本節で用いた 3 品種の越冬芽の耐凍性は、10 月から 2 月にかけて向上し、3 月末にかけて減衰した (Fig. 5 A)。*‘メイヴ’*の越冬芽は、10 月中旬から 2 月中旬までは他の 2 品種よりも高い耐凍性を示したが、2 月中旬以降の脱馴化が早く、3 月には他の品種と同程度の耐凍性を示した。

当年生枝の耐凍性は、10 月下旬から 12 月中旬まで向上し、2 月中旬まで高いレベルを維持した後、3 月下旬まで減衰した (Fig. 5 B)。*‘メイヴ’*の当年生枝は 10 月上旬、10 月中旬、12 月中旬および 2 月中旬において、他の 2 品種よりも高い耐凍性を示した。*‘メイヴ’*の当年生枝も、越冬芽と同様に脱馴化が早く、3 月下旬には *V. vinifera* の 2 品種と同程度の耐凍性を示した。

2-2-3-2. 越冬芽の含水率、可溶性炭水化物、プロリンおよび総フェノール含量の季節変動および品種間差

越冬芽の含水率は、*V. vinifera* の 2 品種では 10 月中旬から下旬にかけて低下し、その後 3 月下旬までほぼ一定に維持された (Fig. 6 A)。一方、*‘メイヴ’*では、秋季における越冬芽の含水率の低下の度合いが顕著で、10 月上旬 (75.1%) から 10 月下旬 (39.6%) にかけて急激に低下した。

越冬芽のグルコース、フルクトースおよび総可溶性炭水化物 (TSC) 含量は、いずれの品種においても 10 月下旬から 2 月中旬にかけて増加し、3 月下旬まで減少した (Fig. 6 B, C, G)。スクロース含量は品種間で異なる季節変動を示した。*‘メイヴ’*では 10 月から 2 月中旬まで増加し 3 月末にかけて減少と、単糖類と同様の季節変動を示した (Fig. 6 D)。これに対して、*‘ピノ・ノワール’*および*‘ケルナー’*では、3 月下旬までスクロース含量の増加が続いた。ラフィノースおよびスタキオース含量は 10 月上旬または中旬から 12 月中旬にかけて増加し、その後 3 月下旬にかけて減少した (Fig. 6 E, F)。

越冬芽の可溶性炭水化物の組成について、‘メイヴ’は他の2品種とは異なる挙動を示した。すなわち、‘メイヴ’では12月中旬にはスクロース含量が多く、スタキオース含量が少なかった (Fig. 6D,F)。また、2月中旬には越冬芽のTSC含量が他の2品種より多い傾向を示したが、3月にはフルクトースおよびTSC含量がいずれも他の2品種より少なかった (Fig. 6B, G)。

越冬芽のプロリン含量は、3品種とも12月中旬から3月下旬までわずかに増加する傾向がみられた (Fig. 6H)。2月には、‘メイヴ’の越冬芽のプロリン含量が他の2品種よりも多かった。越冬芽のTPCにはほとんど季節変動がみられなかったが、‘ケルナー’は他の2品種より一貫して高い値を示し、特に10月上旬と12月中旬には有意に高かった (Fig. 6I)。

2-2-3-3. 当年生枝の含水率、可溶性炭水化物、プロリンおよび総フェノール含量の季節変動と品種間差

ブドウ3品種の当年生枝の含水率は、10月中旬から2月中旬にかけて低下した (Fig. 7A)。2月中旬の当年生枝の含水率は、‘メイヴ’が‘ピノ・ノワール’より低かった。‘メイヴ’のみ含水率に有意な季節変動がみられ、脱馴化期の2月中旬 (43.4%) から3月下旬 (48.1%) にかけてわずかに上昇した。

当年生枝に含まれる全ての可溶性炭水化物含量は、3品種とも10月下旬から12月中旬にかけて増加した (Fig. 7A–G)。^{*} ‘メイヴ’ではすべての可溶性炭水化物含量が2月に最大となり、ほぼすべての種類の可溶性炭水化物で他の品種より多かった。

当年生枝のプロリン含量はすべての品種で12月中旬から3月下旬まで増加傾向を示した (Fig. 7H)。この傾向は特に‘メイヴ’で顕著であったが、有意な品種間差は検出されなかった。TPCについては、いずれの採取日においても品種間差は検出されなかった (Fig. 7I)。

2-2-3-4. 耐凍性と、含水率および組織内成分との関連

3品種の越冬芽および当年生枝におけるLT₅₀と、含水率、可溶性炭水化物、プロリンおよび総ポリフェノール含量との関連を、ピアソンの相関分析を用いて調べた (Table 11)。

越冬芽の含水率とLT₅₀の間には、‘ピノ・ノワール’および‘ケルナー’では有意な正の相関が認められた。‘メイヴ’では相関係数が小さく、他の2品種よりも弱い関連を示した。可溶性炭水化物については、3品種すべてでLT₅₀とフルクトース、グルコース、スクロース、ラ

フィノースおよび TSC 含量の間に強い負の相関が認められた。すなわち、これらの成分含量が多いほど、耐凍性が高い傾向にあることを示す。スタキオースについては、LT₅₀ との間に負の相関が見られたのは‘メイヴ’のみであった。プロリン含量および TPC と LT₅₀ との間には有意な相関は認められなかった。

当年生枝においては、3 品種すべてにおいて LT₅₀ と含水率との間に正の相関が認められた。また、フルクトース、グルコース、ラフィノース、スタキオースおよび TSC 含量は、LT₅₀ との間に強い負の相関を示した。スクロースについては‘ピノ・ノワール’でのみ LT₅₀ との間に 10%水準の弱い負の相関が認められた。プロリン含量および TPC と LT₅₀ との間には有意な相関は認められなかった。

2-2-4. 考察

2-2-4-1. 越冬芽および当年生枝における耐凍性の季節変動および品種間差

ブドウ 3 品種の越冬芽および当年生枝の耐凍性は、外気温の低下に伴って、10 月上旬から 12 月中旬まで向上し、2 月中旬から 3 月下旬まで減衰した (Fig. 4, 5)。本節で使用した‘ピノ・ノワール’と‘ケルナー’は *V. vinifera* 品種であり、‘メイヴ’は *V. riparia* と *Vitis* 属の交配品種である (Fujie et al., 2025; 田中・石村, 2020)。 *V. riparia* は *V. vinifera* よりも低温馴化および脱馴化速度が早く、冬の耐凍性が高いことが複数の研究によって報告されている (Grant and Dami, 2015; Karimi et al., 2015; Kovaleski et al., 2019)。*‘メイヴ’*の越冬芽と当年生枝の耐凍性は、10 月下旬から 12 月中旬にかけて急速に向上し、12 月中旬と 2 月中旬には他の 2 品種よりも高かった。一方、2 月中旬から 3 月下旬にかけて耐凍性は急速に減衰した (Fig. 5)。この結果は、*V. riparia* に関するこれまでの研究の結果と矛盾しないと考えられた。

越冬芽の含水率は *V. vinifera* の 2 品種において、10 月中旬以降に有意に低下した一方、冬期に高い耐凍性を示した‘メイヴ’では、含水率の低下が *V. vinifera* の 2 品種よりも早く始まった (Fig. 6 A)。これは、*V. riparia* 品種が *V. vinifera* 品種よりも低温馴化期における含水率低下の開始時期が早いことを示した先行研究の結果とも矛盾しない (Londo et al., 2019; Proebsting et al., 1980; Zhang and Dami, 2012)。全ての品種において、低温馴化期における越冬芽の含水率の低下と、その後早春までの比較的安定した水準での推移は、先行研究の報告と一致した (Fennell, 2004; Kaya and Köse, 2017)。*‘メイヴ’*の越冬芽において、10 月上旬から 10 月下旬にかけて可溶性炭水化物含量に変化がないにもかかわらず、耐凍性が向上したことから (Fig. 5 A, 6 B–G)、これは含水率の急激な低下が耐凍性の向上に寄与した可能性を示唆している。

2-2-4-2. 越冬芽および当年生枝における耐凍性と可溶性炭水化物含量の関連

当年生枝の含水率は、10 月下旬から 2 月中旬にかけて低下し、その後 3 月下旬にかけて上昇傾向を示し、耐凍性の低下と一致した (Fig. 5 B, 7 A; Table 11)。この結果は、低温馴化期から厳冬期にかけてブドウの当年生枝の含水率が減少することを報告した先行研究と一致している (Karimi, 2020)。したがって、当年生枝においても、含水率の低下が耐凍性の向

上に寄与したことが考えられる。

器官間で含水率を比較すると、12月中旬から2月中旬にかけて、越冬芽は当年生枝より低い含水率を示した (Fig. 6 A, 7 A)。この結果は、休眠中のブドウ樹において越冬芽の含水率が当年生枝よりも低いことを報告した先行研究と一致する (Xie et al., 2018)。この含水率の差異を生じさせる要因として、両器官の間に形成されるペクチン質を含むバリアの存在が挙げられる (Jones et al., 2000)。Jones et al. (2000) は、ブドウ越冬芽を用いて分子量 3,000 のデキストラン結合ローダミンググリーンを用いた染色試験を行い、厳冬期の LTE が -20°C を下回る時期において、当年生枝側からの染色液が越冬芽へ透過しないことを確認した。この結果は、当該バリアが当年生枝側からの氷の伝播を物理的に阻害し、越冬芽の過冷却維持に寄与していることを示唆する。バリアの透過特性について、レンゲツツジの小花梗を対象とした研究において詳細に調べられている。レンゲツツジの小花梗に存在するバリアは氷の伝播は阻止する一方で、水や水蒸気の移動に対しては緩やかな透過性を持つことが明らかにされている (Ishikawa and Sakai, 1981, 1985)。このバリアの透水性により、器官外の氷晶と小花内の過冷却水との水ポテンシャル差によって、小花内の水が小花梗を通じて芽鱗片へ移動する器官外凍結が起こり、小花内の過冷却能力が高まるとされる。ブドウにおいても同様に、越冬芽と当年生枝の間のバリアは、氷の侵入を防ぐ一方で、分子サイズの小さい水分の移動は許容するため、越冬芽から当年生枝への凍結脱水が促進されたと考えられる。

実際、ブドウ越冬芽では、走査型電子顕微鏡 (Cryo-SEM) を用いた観察により、部分的な脱水を伴う器官外凍結が起こることが報告されている (Kasuga et al., 2020)。さらに Horiuchi et al. (2021) は、凍結脱水された氷が蓄積する場所が、当年生枝の師部と皮層の空間に蓄積する可能性を指摘している。本節で得られた含水率の結果は、Cryo-SEM を用いた先行研究の観察と整合しており、越冬芽と当年生枝の含水率の差は、越冬芽から当年生枝にかけての凍結脱水によるものである可能性がある。

2-2-4-3. 越冬芽および当年生枝における耐凍性と組織内成分の関連

木本植物における耐凍性の向上には、単糖および二糖の蓄積による細胞内の浸透濃度の上昇が関連することが知られている (Strimbeck et al., 2015)。本節においても、ブドウ越冬芽と当年生枝における TSC (主に単糖類) 含量と LT_{50} との間に強い負の相関関係が認められた (Fig. 5, 6 B-H, 7 B-H; Table 11)。これは、TSC 含量が高いほど LT_{50} が低く、耐凍性が高いことを示している。これらの結果は、既往のブドウ研究と一致した (Ershadi et al., 2016;

Grant and Dami, 2015; Jones et al., 1999; Karimi, 2020; Todaro and Dami, 2017)。さらに、糖類の蓄積が耐凍性に及ぼす影響をより直接的に示した報告もある。Sarikhani et al. (2020) は、ブドウの果実収穫後 (10 月) に全ての葉を刈り取る摘葉処理を行うと、厳冬期 (2 月) において越冬芽および当年生枝の TSC 含量が対照区よりも減少し、耐凍性もそれぞれ 2.9、3.8°C 低下することを報告している。具体的には、摘葉により越冬芽および当年生枝の TSC 含量がそれぞれ 2.3、4.4 mg/ g DW 減少し、これは対照区に対して 12、18% と大幅な減少に相当する。同報告における TSC の定量は比色定量法 (アンスロン硫酸法) を用いているため、HPLC を用いた本研究の結果と測定値を単純に比較することはできないが、光合成産物の供給を断つことで糖類の蓄積が阻害され、その結果として耐凍性が獲得が緩慢となったことは、可溶性炭水化物含量の増加がブドウ越冬芽および当年生枝の耐凍性の向上に重要な役割を果たすことを強く支持している。

越冬芽および当年生枝の耐凍性および可溶性炭水化物含量の季節変動を比較したところ、品種間および器官間に顕著な差異が認められた。‘メイヴ’の越冬芽では、スクロース含量は単糖と同様の季節変動を示し、10 月下旬から 2 月中旬まで増加し、その後 3 月下旬に減少し (Fig. 6 D)、先行研究の結果と一致した (Grant and Dami, 2015)。一方で、*V. vinifera* の 2 品種の越冬芽と、3 品種の当年生枝では、スクロース含量は 10 月下旬から 3 月下旬にかけて増加した (Fig. 6 D, 7 D)。ブドウ樹体では、春に萌芽に向けて、当年生枝やその他の器官に蓄えられたデンプンがスクロースに分解され、植物体全体に転流されることが知られている (Swanson and El-Shishiny, 1958)。したがって、春季に当年生枝のスクロース含量が増加するのは、萌芽の準備に伴う糖代謝によるものと考えられる。

RFO に分類されるラフィノースとスタキオースの含量は、越冬芽では耐凍性が最大になる 2 月より前の 12 月中旬にピークに達した (Fig. 6 E, F)。その後、これらは耐凍性が最大になる 2 月中旬まで減少した。一方、当年生枝では RFO 含量は 2 月中旬に最大となり先行研究の結果と一致した (Grant and Dami, 2015; Jones et al., 1999)。RFO は適合溶質としての機能に加えて、膜構造の安定化や、酸化ストレスを軽減に寄与するといわれている (Hinch et al., 2003; Nishizawa et al., 2008)。本節において、越冬芽の RFO 濃度は 12 月中旬から 2 月中旬にかけて減少し、分解産物であるスクロース濃度は増加した (Fig. 6 D–F)。ブドウは低温ストレス下で高次の糖が加水分解されて可溶性糖が蓄積し、浸透圧濃度を上昇させると報告されている (Zhang et al., 2012)。これらの知見を総合すると、12 月中旬から 2 月中旬にかけて、越冬芽の RFO が分解されることで低次の糖が蓄積され、細胞内の浸透濃度が上昇し、耐凍性の向上につながったと推察される。

越冬芽および当年生枝に含まれる RFO 含量は、単糖および二糖含量と比較して約 1/4–1/9

と低水準であった (Fig. 6B–F, 7B–F)。一般に、浸透圧調節による耐凍性への寄与は浸透濃度に依存するため、RFO の量的寄与は限定的であると考えられる。しかし、RFO には浸透圧調節とは異なる特異的な機能が報告されている。すなわち、RFO はスクロースと共存することで、スクロースの結晶化を抑制し、細胞質のガラス化 (vitrification) を促進する役割を担うことが報告されている (Koster and Leopold, 1988)。低温および乾燥ストレス下において形成されるガラス化状態は、細胞内の微細構造を物理的に安定化させ、細胞の生存を維持する上で重要である (Hinch et al., 2003)。以上の知見を踏まえると、本節においてブドウ越冬芽および当年生枝から検出された RFO は、その絶対量は少ないものの、多量に存在するスクロース等と協調的に作用することで、ガラス形成能を高め、結果として耐凍性の維持に寄与している可能性が考えられる。

越冬芽の耐凍性と TSC およびフルクトース含量との相関は、‘メイヴ’よりも‘ピノ・ノワール’および‘ケルナー’で有意に高かった (Table 11)。一方、‘メイヴ’の越冬芽は他の 2 品種と比較して、冬季に顕著にスクロース含量が多く、これは耐凍性と密接な関係を示した (Fig. 6D; Table 11)。これらの結果は、越冬芽の耐凍性獲得に寄与する主要な糖の種類や代謝調節機構に品種間差が存在することを示唆している。

一方で当年生枝の各可溶性炭水化物含量の品種間差に着目すると、‘メイヴ’は冬季にグルコース含量が顕著に増加し、他の 2 品種よりも耐凍性との相関が強かった (Fig. 7B–G; Table 11)。これらの結果は、越冬芽とは異なり当年生枝においては単糖類の蓄積が、低温下での細胞外凍結に伴う凍結脱水に対する耐性を向上させている可能性を示唆している。

プロリンは生物毒性の低い溶質であり、ストレス条件下でも植物細胞内に高濃度で存在できることが知られている (Ashraf and Foolad, 2007)。植物体内のプロリン濃度は、低温や乾燥などの非生物ストレスに反応して増加し、細胞内の浸透圧調節物質として機能する (Ghosh et al., 2022)。特に低温下において、プロリンは細胞内の浸透濃度の上昇を介して凝固点を降下させ、結果として耐凍性を強化する作用をもつ (Ghosh et al., 2022)。実際に最も濃度が高くなった 2 月における‘メイヴ’の越冬芽では、プロリン含量は $150\text{ }\mu\text{mol/g DW}$ であり、この際の含水率は 38.3%であった。これは $0.24\text{ mol/kg H}_2\text{O}$ に相当し、仮に全て細胞内に含まれると仮定すると、組織内の水の凍結を 0.45°C 凝固点降下させることになる。しかし本研究では、‘ピノ・ノワール’の当年生枝を除いたすべてのサンプルにおいて、プロリン含量と耐凍性との間に有意な相関は認められなかった (Table 11)。この結果は、イラン産のブドウ越冬芽および当年生枝で冬季にプロリンが増加し、春季に減少したとする先行研究とは一致しなかった (Ershadi et al., 2016; Karimi, 2020)。本節では、プロリンの春季における増加傾向は確認されたものの、耐凍性との統計的関連は明確でなかったため、今後の研究で詳

細に検討する必要がある。

TPC は、‘ケルナー’の越冬芽で 10 月上旬から 12 月末にかけて減少し、他の 2 品種の越冬芽や 3 品種すべての当年生枝では、採取時期による有意差は検出されなかった (Fig. 6I, 7I)。また、いずれの品種においても、越冬芽および当年生枝の TPC と耐凍性との間に有意な相関は認められなかった (Table 11)。この結果は、11 月から 3 月にかけて TPC が上昇することを報告した先行研究の結果とは異なった (Karimi, 2017, 2020)。フェノール化合物は、氷核形成阻害効果を示すものと氷核形成促進効果を示すものが存在することが報告されており (Kuwabara et al., 2013, 2011, 2012; Wang et al., 2012)、ブドウ越冬芽にはヴィニフェリン、レスベラトロール、カテキンなどの多様なフェノール化合物が含まれ (Karimi, 2017; Qsaib et al., 2014)、それぞれ異なる生理機能や氷核形成阻害あるいは促進効果を持つことが報告されている。したがって、フェノール化合物全体としては耐凍性と関連が検出されなかったとしても、特定のフェノール化合物の組成変化が耐凍性に影響を与えている可能性は依然として考えられる。本節の結果では、耐凍性と TPC との直接的な関連は認められなかったが、今後は個々のフェノール化合物の定量と、それぞれが耐凍性にかかわる機能的役割を解明する必要がある。

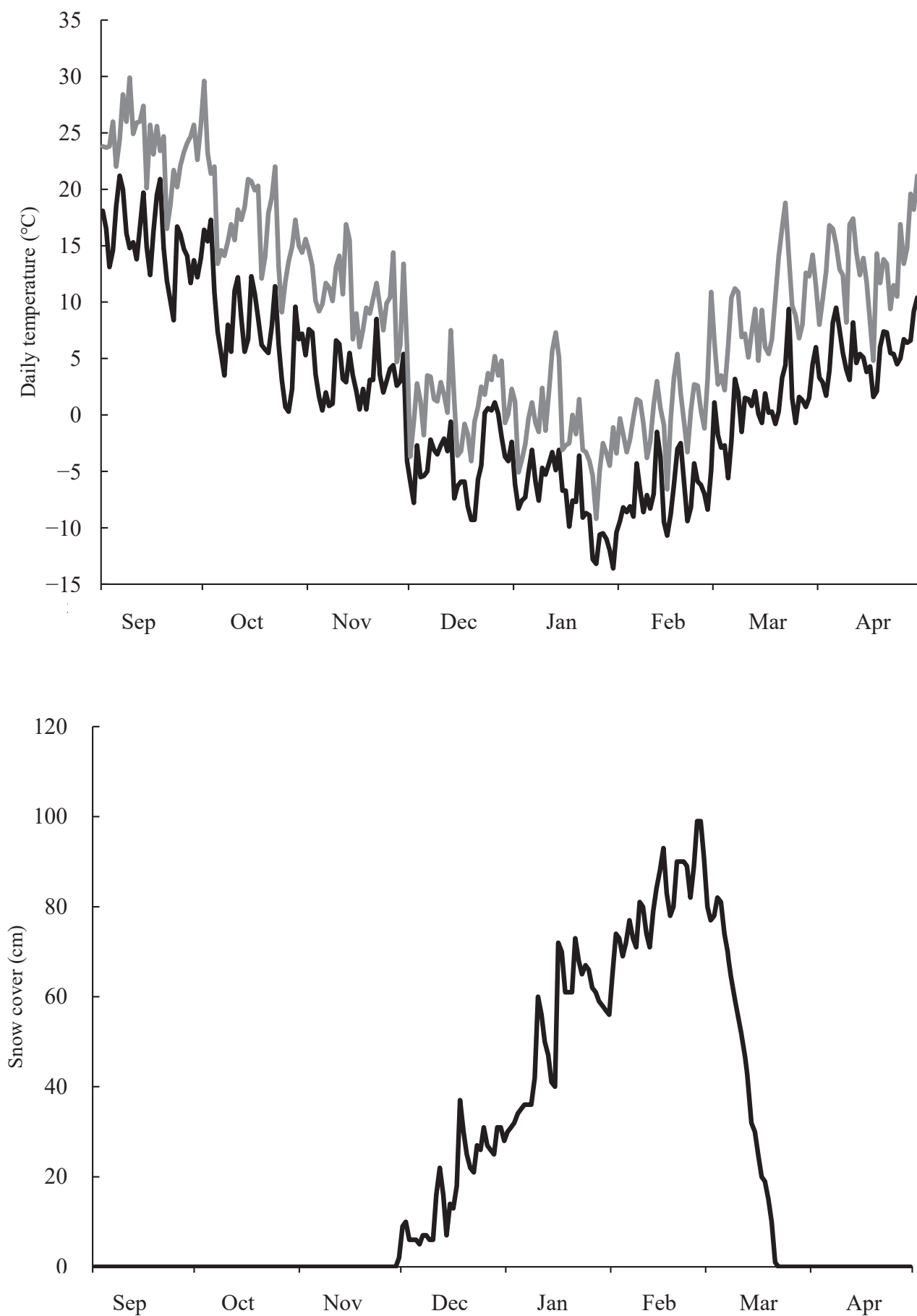


Fig. 4. (A) Change in the daily minimum (black line) and maximum (gray line) air temperature and (B) snow cover during the experiment period (October 2022 to April 2023).

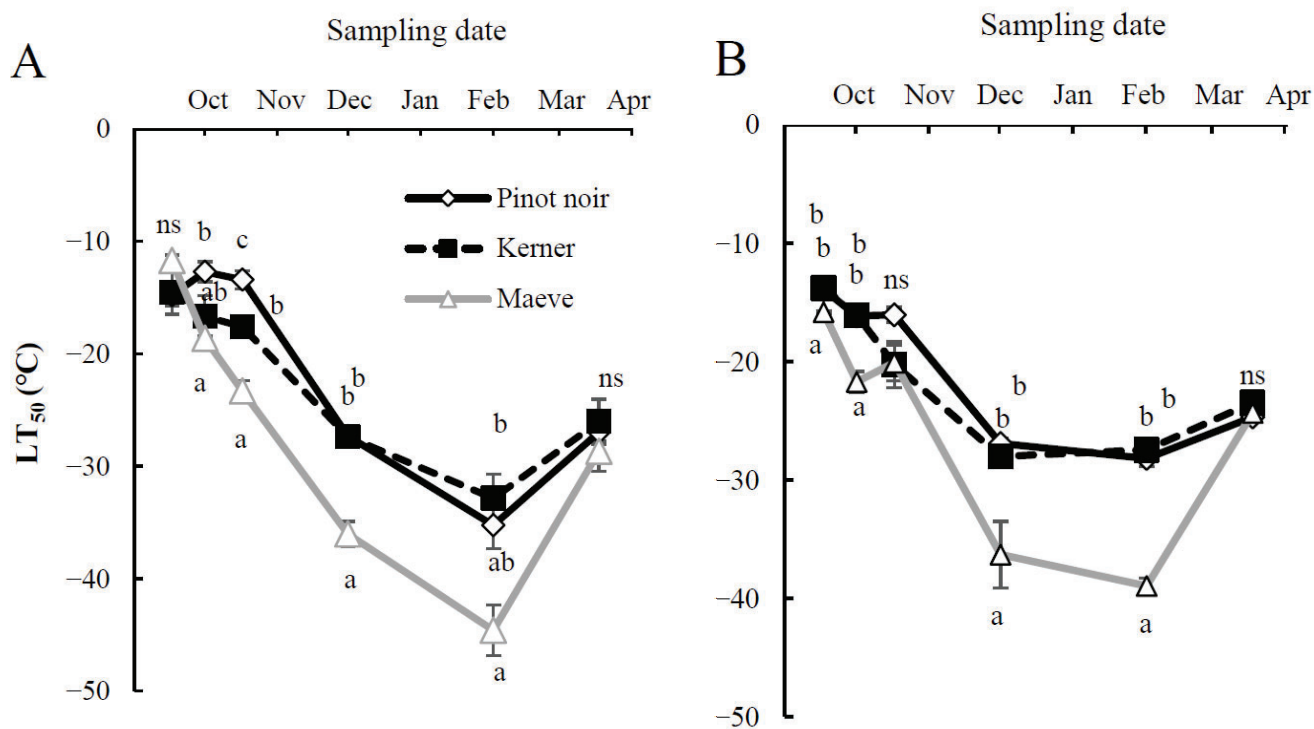


Fig. 5. Seasonal variation and cultivar differences of cold resistance in buds (A) and canes (B) LT_{50} measured by electrolyte leakage method.

Data represents mean value $\pm$ S.E. ($n = 3$). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey-Kramer's test.

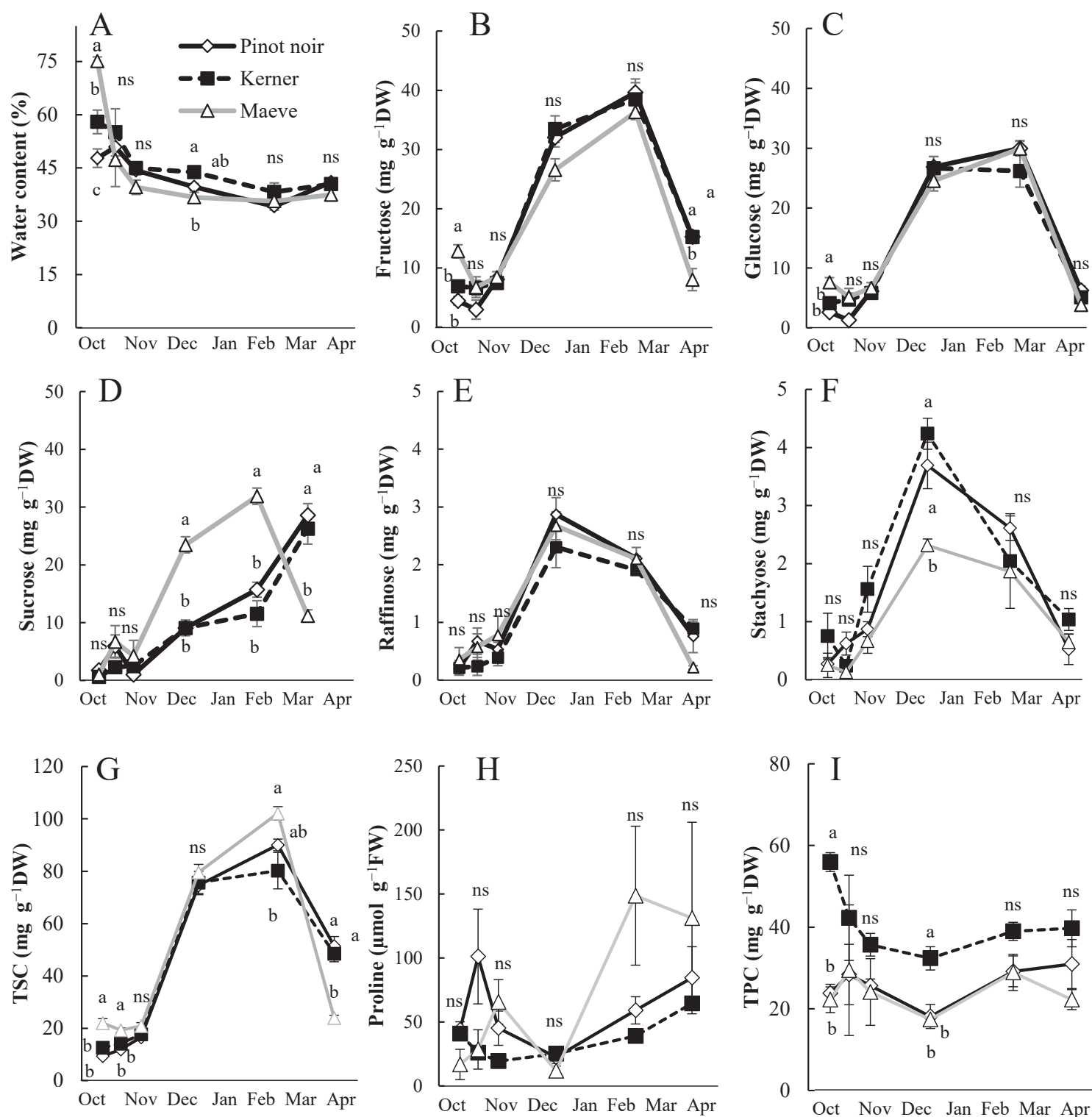


Fig. 6. Seasonal variation and cultivar differences in water content(A), fructose(B), glucose(C), sucrose(D), raffinose(E), stachyose(F), total soluble content (G), proline(H) and total phenolic content(I) of buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 4). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

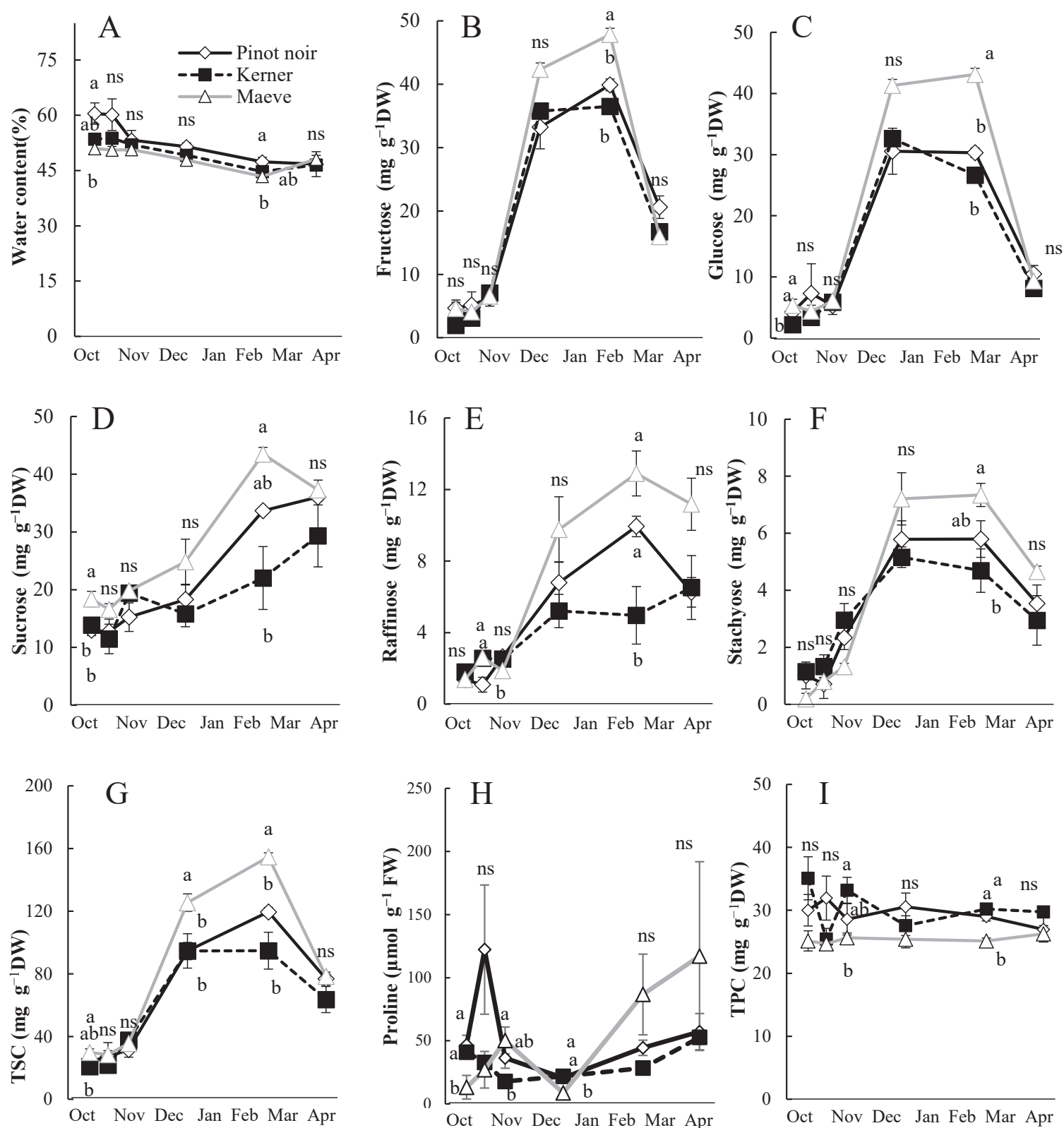


Fig. 7. Seasonal variation and cultivar differences in water content(A), fructose(B), glucose(C), sucrose(D), raffinose(E), stachyose(F), TPC; total soluble content(G), proline(H) and TPC; total phenolic content(I) of canes.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 4). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

Table 11. Pearson correlation coefficients between LT₅₀ and water content, soluble carbohydrates content, proline, and total phenolic content in buds and canes of three *Vitis* cultivars.

	Bud			Cane		
	Pinot noir	Kerner	Maeve	Pinot noir	Kerner	Maeve
Water Content	**	*	†	*	*	*
Fructose	**	**	*	**	**	***
Glucose	*	*	*	*	*	**
Sucrose	ns	ns	**	†	ns	ns
Raffinose	†	*	†	**	*	*
Stachyose	ns	ns	*	**	***	**
TSC	**	**	*	***	***	**
Proline	ns	ns	ns	*	ns	ns
TPC	ns	ns	ns	ns	ns	ns

−1



1

***, **, * and † represent significant at 0.1%, 1%, 5% and 10% levels of Pearson's correlation analysis respectively, ns means no significance (n = 6).

TSC: total soluble carbohydrates, TPC: total phenol content.

第3節 越冬芽および当年生枝における耐凍性と、含水率、可溶性炭水化物、デンプン、アミノ酸およびフェノール化合物含量との関連性

2-3-1. 緒言

本章第1節および第2節において、ブドウ越冬芽および当年生枝では、含水率および可溶性炭水化物含量が耐凍性と強い関連を示した。また、可溶性炭水化物については、耐凍性と密接な関連のある化合物種が品種特異的であることが明らかとなった。その一方で、プロリンおよび総フェノール化合物含量については、先行研究で報告されている結果 (Karimi, 2017, 2020) とは異なり、耐凍性との間に有意な相関は認められなかった (Fig. 6, 7)。

木本植物では、アミノ酸含量の季節変動に基づき、冬季に、①アルギニンのみ蓄積する種、②プロリンのみ蓄積する種、③アルギニンおよびプロリンの双方を蓄積する種の3つに分類されることが知られている (酒井・吉田、1983)。また、ポリフェノールはその化学種によって氷核形成阻害効果が異なることが報告されており (Kuwabara et al., 2011, 2013)、その役割や季節変動は一様ではない可能性がある。

さらに、本章第1節および第2節で用いた異なる耐凍性評価手法の間には、同じ品種であっても得られた値に数度から十数度の差がみられた (Table 2; Fig. 5)。このため、どちらの方法がよりブドウ越冬芽および当年生枝の耐凍性を測定するうえで信頼性の高い指標となるかを検討する必要がある。

そこで本節では、示差熱分析および電解質漏出法によってブドウ越冬芽および当年生枝の耐凍性を評価するとともに、Cryo-SEM によって低温条件における越冬芽の形態を観察し、両手法の特性を比較検討した。さらに、本節の耐凍性試験で品種間差がみられた‘清舞’、‘メイヴ’および‘ピノ・ノワール’の3品種の越冬芽および当年生枝について、前節で調べた成分に加えて、各種アミノ酸およびフェノール化合物を LC-MS により分別定量し、各成分と耐凍性との関連を詳細に解析した。

2-3-2. 材料および方法

2-3-2-1. 植物材料

前節と同様に、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター実験農場（北海道札幌市）に植栽された、7年生のブドウ属品種‘デラウェア’、‘ケルナー’、‘清舞’、‘清見’、‘メイヴ’、‘ピノ・ノワール’および3年生の *V. vinifera* 品種‘ソーヴィニヨンブラン’の7品種を供試した。採取は2024年10月11日、11月11日、12月21日、2025年1月21日、2月26日および4月5日の合計6回行った。採取部位は前節と同様とした。

2-3-2-2. 気象データ

前節と同様に、農研機構メッシュ農業気象データシステムを用いて実験圃場における日最高気温、日最低気温および積雪量のデータを取得した。

2-3-2-3. 耐凍性試験

越冬芽および当年生枝の耐凍性は、示差熱分析および電解質漏出法の2つの方法を用いて評価した。両手法の詳細は、それぞれ第1節および第2節に記載した通りである。越冬芽の示差熱分析は、1つの樹体につき2個または3個について測定を行い、その平均値を1試料（ $n=1$ ）として算出した。また、冷却処理前から死滅していた越冬芽のデータを除外するため、先行研究の方法に準じて、冷却処理後直ちに越冬芽を剪定鋏で切断し、主芽の切断面に褐変が認められた越冬芽は測定対象から外した（Tsumura et al., 2019）。当年生枝の示差熱分析は、約1 cm の長さに切断した当年生枝の切断面に熱電対を取り付け、パラフィルムで固定したのち、第1節と同様の方法で冷却し温度を記録した。

2-3-2-4. Cryo-SEM を用いた凍結前後の越冬芽細胞の観察

ブドウ越冬芽の耐凍性評価において、示差熱分析と電解質漏出法のどちらの方法がより信頼性の高い指標となるかを検討するため、Cryo-SEM を用いて異なる低温条件における越冬芽の組織細胞構造を観察した。すなわち、深過冷却や過冷却打破などの実際の組織細胞の凍結挙動と、両手法による障害発生温度とを比較することで、耐凍性評価手法としての適合度を検証しようとした。供試した品種は、2025年2月26日に実施した耐凍性試験において明

確な耐凍性差が認められた‘メイヴ’および‘ピノ・ノワール’の2品種とした。越冬芽は2025年2月26日に採取し、4°Cの冷蔵庫で密閉できるポリエチレン袋内で1日保存した越冬芽を使用した。

緩速冷却およびCryo-SEMによる観察はHoriuchi et al. (2021)の方法に従って行った。まず、当年生枝から越冬芽を切り出し、当年生枝部分を厚さ約0.5 mm程度となるように剪定鋏でトリミングした。越冬芽をアルミ製の特製ホルダー（直径約5 mm）の凹部にヤマトノリを用いて固定した。試料の入ったホルダーをプログラムフリーザーに入れ、5°C/hの速度で、越冬芽の表面温度が-20°C または-25°C となるまで冷却し、それぞれ高温処理区（HT区）、低温処理区（LT区）とした。目的の温度まで達したのち、直ちにプログラムフリーザー内で液体窒素に浸漬して急速凍結固定した。比較のため、緩速冷却を行わず、室温（約25°C）から液体窒素に浸漬して急速凍結固定した試料も作成した。急速凍結固定した試料は観察まで液体窒素中で保管した。

Cryo-SEM法による観察はCryo-SEM（JSM-6701F；JEOL、日本）を用いて行った。急速凍結固定した試料を減圧し-110°Cに設定したコールドステージ内（Alto 2500；Gatan Inc.、USA）に移し、10分間温度平衡化した後、ナイフを用いて切断した。-95°Cの試料温度で、切断面を5分間エッチングし、金-パラジウムを180秒または240秒間蒸着した。蒸着後、試料を-160°Cに設定したSEMステージに移し、二次電子放出像を加速電圧10 kV下で観察した。

2-3-2-5. 含水率測定

前節と同様に測定した。測定後の試料は粉末状にし、可溶性炭水化物定量分析に供試した。

2-3-2-6. 可溶性炭水化物含量の定量分析

供試した7品種のうち、耐凍性に差がみられた‘清舞’、‘メイヴ’および‘ピノ・ノワール’について、成分分析に供試した。可溶性炭水化物の定量分析は、第1節と同様の手法で、LC-MSを用いて定量した。

2-3-2-7. デンプンの定量分析

デンプンはアンスロン硫酸法による比色定量によって測定した（植物栄養実験法編集委員

会,1997)。まず、可溶性炭水化物抽出後に得られたエタノール抽出残渣に 80% (v/v) エタノール 1,000 μ L を加え、70°C で 30 分間抽出した。抽出後、14,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。この操作を同様に 2 回繰り返した。得られた残渣からエタノールを遠心エバポレーターを用いて除去し乾固させた。乾固した残渣に蒸留水 200 μ L を加え、100°C で 10 分間加熱した後、8.14N の過塩素酸を 200 μ L 加え 5 分間振とう抽出した。これを室温 (約 25°C) で 15 分間静置し、さらに蒸留水 200 μ L を加え、14,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。同じ操作をもう一度行い、得られた上清を合わせて、蒸留水で 10 mL に定容し、これを試料抽出液とした。

定量反応は以下の手順で行った。氷水上に立てた 1.5 mL 容マイクロチューブに試料抽出液 100 μ L を加え、0.2%アンスロン硫酸 200 μ L を静かに加えてボルテックスミキサーで混合した。これを 100°C のドライバスで 7.5 分間加熱し反応させ、反応直後はすぐに氷水中で急冷したのち、室温 (約 25°C) で 30 分間静置した。反応液 120 μ L を 96 穴マイクロプレートに分注し、630 nm における吸光度を測定した。検量線の作成にはグルコース水溶液を使用し、測定された吸光度に 0.9 を乗じてデンプン相当量に換算して検量線を作成した。デンプン含量は越冬芽または当年生枝の乾燥重 1 g あたりの含量で表した。

2-3-2-8. アミノ酸の定量分析

アミノ酸含量の定量分析は、Liu and Rochfort (2013) の方法を一部改変して行った。すなわち、0.01 mg 単位の電子天秤を用いて秤量した越冬芽または当年生枝の凍結乾燥粉末 20 mg に 80% (v/v) メタノール 1,000 μ L と内部標準物質として 80% (v/v) メタノールに溶解した 100 mg/L のテアニン 50 μ L を加えた。また、後述のフェノール化合物定量の際の内部標準として 80% (v/v) メタノールに溶解した 100 mg/L のクロラムフェニコール 50 μ L を加えた。それをボルテックスミキサーで 1 分間攪拌した後、超音波洗浄機 (UT-51N, Sharp) を用いて 15 分間超音波処理を行った。続いて、4°C、14,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離を行い、上清をメンブレンフィルター (PTFE、0.22 μ m、Advantec) で濾過し、HPLC バイアル (Shimvial H、島津製作所) に移した。

分析には超高速液体クロマトグラフ Nexera™ (島津製作所) とシングル四重極質量分析計 LCMS-2050 (島津製作所) を用いた。分析条件は以下の通りである。LC 条件; 移動相: (A) 0.1%ギ酸水溶液、(B) 0.1%ギ酸性メタノール; グラジエント: 0–16.5 分 5–100% (B)、16.5–17.0 分 100% (B)、17.0–17.5 分 100–5% (B)、17.5–19.5 分 5% (B); カラム: Synergi Hydro RP (4.6 $\times$ 250 mm、4 μ m、Phenomenex、USA); カラム温度: 30°C (CTO-40C; 島津製作所);

流速：0.5 mL/min；オートサンプラー：SIL-40C（島津製作所）；注入量：5 µL。

MS 条件；イオン化法：デュアルイオン化モード（ESI/APCI, DUIS）、ポジティブイオンモード、測定モード：SIM、ネブライザーガス：N₂、3.0 L/min、ドライガス：N₂、450°C、5.0 L/min、インターフェイス電圧 2 kV。

各アミノ酸のピーク面積は Labsolution（島津製作所）を用いて計算し、内部標準法により、越冬芽または当年生枝の乾燥重 1 g あたりの含量で表した。また、検出された 19 種類のアミノ酸含量を合算し、総アミノ酸含量（TAC; Total Amino acid Content）として算出した。

2-3-2-9. フェノール化合物の定量分析

抽出試料中のフェノール化合物の定量分析は Qsaib et al. (2017) および Karimi (2017) の手法を一部改変して行った。すなわち、前項に記載した方法で抽出した越冬芽および当年生枝のメタノール抽出液を、超高速液体クロマトグラフ Nexera™（島津製作所）とシングル四重極質量分析計 LCMS-2050（島津製作所）を用いて定量した。分析条件は以下の通りである。LC 条件；移動相：(A) 0.1%ギ酸水溶液、(B) 0.1%ギ酸性アセトニトリル；グラジエント：0–5 分 5% (B)、5–25 分 5–50% (B)、25–27 分 50–100% (B)、27–29 分 100% (B)、29–30 分 100–5% (B)、30–31 分 5% (B)；カラム：Shim-pack GIST C18（2.1×150 mm、粒子径 3 µm、島津製作所）；カラム温度：30°C（CTO-40C；島津製作所）；流速：0.125 mL/min；オートサンプラー：SIL-40C（島津製作所）；注入量：5 µL。

MS 条件；イオン化法：デュアルイオン化モード（ESI/APCI, DUIS）、ポジティブおよびネガティブイオンモード、測定モード：SIM、ネブライザーガス：N₂、3.0 L/min、ドライガス：N₂、450°C、5.0 L/min、インターフェイス電圧、-2.0 または 2.0 kV。

標準物質には、カフェ酸（フェノール酸類）エピカテキン（フラバン-3-オール類）、ケルセチン二水和物（フラボノール類）、およびレスベラトロール（スチルベン類）およびクロラムフェニコール（内部標準物質）を使用した。各フェノール化合物のピーク面積は Labsolution（島津製作所）を用いて計算し、内部標準法により、各化合物群について標準物質当量として定量し、越冬芽または当年生枝の乾燥重 1 g あたりの含量で表した。フェノール酸類については定性できなかったため、測定項目から除外した。

2-3-2-10. 統計解析

耐凍性、含水率、各可溶性炭水化物、アミノ酸およびフェノール化合物含量について、2-

1-2-6. と同様に統計解析を行った。

2-3-3. 結果

2-3-3-1. 越冬芽および当年生枝における耐凍性の季節変動と品種間差異

実験期間中の圃場における日最低気温は、2024 年 11 月 18 日に初めて氷点下となり、その後 2025 年 3 月下旬まで氷点下で推移した (Fig. 8 A)。年最低気温は 2025 年 1 月 19 日に観測された -8.5°C であった。積雪深は 2024 年 12 月 24 日にコルドンの高さ (約 30cm) を超え、3 月 25 日までコルドンを完全に覆っていた (Fig.8 B)。

本節では、ブドウ 7 品種の越冬芽と当年生枝の耐凍性を、電解質漏出法および示差熱分析によって評価した。当年生枝の示差熱分析では、HTE は認められたものの、LTE については判然としなかった (Fig. 9)。そのため、当年生枝の耐凍性は、 LT_{50} を用いて評価した。越冬芽の LTE と LT_{50} との間には強い正の相関がみられ ($r = 0.879$ 、 $P < 0.001$ 、 $n = 41$)、ほとんどの群において、LTE の値よりも LT_{50} の値の方が低かった (Table 12 A, B)。

越冬芽の耐凍性は、示差熱分析による評価では、すべての品種において 10 月上旬から 12 月下旬にかけて向上し、その後 2 月下旬まで同程度で推移した後、2 月下旬から 4 月上旬にかけて減衰した (Table 12 A)。電解質漏出法による LT_{50} の評価では、‘ケルナー’、‘メイヴ’、‘ピノ・ノワール’および‘ソーヴィニヨンブラン’は示差熱分析と同様の季節変動を示した。一方で、‘清舞’は 12 月下旬から 1 月下旬にかけても耐凍性が向上し、‘デラウェア’、‘清舞’および‘清見’は 1 月下旬から 2 月下旬にかけて耐凍性が減衰した (Table 12 B)。越冬芽の耐凍性を品種間で比較すると、示差熱分析の結果では、12 月下旬から 2 月下旬の冬期には‘清舞’、‘メイヴ’および‘デラウェア’の順に耐凍性が高く、*V. vinifera* の 3 品種は耐凍性が低かった。‘清見’は両者の中間の値を示した。2 月下旬から 4 月上旬までの脱馴化期においては、‘清舞’が最も脱馴化速度が早かった。電解質漏出法による耐凍性評価でも、‘清舞’および‘メイヴ’は冬季に高い耐凍性を示し、2 月下旬から 4 月上旬までの脱馴化課程においては、‘清舞’が最も脱馴化速度が早かった (Table 12 B)。

当年生枝の耐凍性は、すべての品種において 10 月上旬から 12 月下旬にかけて向上した (Table 12 C)。その後、‘ソーヴィニヨンブラン’は 4 月上旬まで同程度で推移した一方、‘デラウェア’は 1 月下旬以降に、‘ケルナー’、‘清舞’、‘清見’および‘ピノ・ノワール’では 2 月下旬以降 4 月上旬にかけて耐凍性が減衰した。品種間で比較すると、11 月上旬から 4 月上旬まで一貫して‘清見’の耐凍性が高く、*V. vinifera* の 3 品種は耐凍性が低かった。

2-3-3-2. 低温条件における越冬芽の形態

2 月下旬に採取した耐凍性の高い‘メイヴ’および耐凍性の低い‘ピノ・ノワール’の越冬芽について、緩速冷却前後の凍結挙動を Cryo-SEM により観察した (Fig. 10)。凍結前の越冬芽では、両品種とも細胞内小器官が観察され、細胞収縮はみられなかった。−20℃ まで冷却処理をした HT 区 (高温処理区) では、両品種において細胞の軽微な収縮が確認され、特に‘メイヴ’では細胞壁と細胞の間に間隙が生じ、軽度の脱水が生じていることが示唆された。−25℃ まで冷却をした LT 区 (低温処理区) では、‘メイヴ’において著しい細胞収縮が観察され、脱水収縮が進行した状態にあると考えられた。‘ピノ・ノワール’の LT 区では、細胞内に多数の微細な空隙が生じており、これらは細胞内凍結によって生じた氷晶の痕跡と推察された。また、一部の細胞では細胞内小器官の構造が不明瞭となった細胞が確認された。

2-3-3-3. 越冬芽および当年生枝の含水率の季節変動と品種間差異

ブドウ 7 品種の越冬芽の含水率は、10 月上旬から 12 月下旬にかけて減少し、その後 4 月上旬まで同程度の値で推移した (Table 13 A)。品種間で比較すると、1 月下旬および 2 月下旬は‘メイヴ’が最も低い値を示し、1 月下旬は‘ケルナー’が、2 月下旬は‘デラウェア’が高い値を示した。

当年生枝の含水率は‘清見’および‘メイヴ’を除く 5 品種において、11 月上旬から 12 月下旬にかけて減少傾向を示し、その後 2 月下旬まで同程度の値で推移した (Table 13 B)。2 月下旬から 4 月上旬にかけては‘清見’および‘ソーヴィニヨンブラン’において増加した。品種間で比較すると、全期間を通じて‘ソーヴィニヨンブラン’が高く、‘メイヴ’が低い傾向を示した。

2-3-3-4. 越冬芽および当年生枝の可溶性炭水化物の季節変動および品種間差

越冬芽に含まれるフルクトースおよびグルコース含量の季節変動は、‘清舞’および‘ピノ・ノワール’では 10 月上旬から 1 月下旬にかけて増加し、4 月上旬にかけて減少傾向を示した (Fig. 11 A, B)。一方、‘メイヴ’では 10 月上旬から 12 月下旬にかけて増加し、2 月下旬にかけて減少傾向を示した。品種間で比較すると、フルクトースおよびグルコースは 1 月下旬においては‘ピノ・ノワール’で多く‘メイヴ’で少なかった。また、4 月上旬においては‘ピノ・ノワール’が‘清舞’より多かった。

越冬芽のスクロースおよび TSC 含量は、‘清舞’では 10 月上旬から 1 月下旬にかけて増加し、その後 4 月下旬にかけて減少傾向を示した (Fig. 11 C, F)。
‘メイヴ’では 10 月上旬から

11月上旬にかけて増加した後、2月下旬まで大きな変動はみられず、同程度の値で推移した。‘ピノ・ノワール’はスクロースに有意な季節変動は検出されなかったものの、10月上旬から1月下旬にかけて増減を繰り返した。品種間で比較すると、スクロースは‘清舞’が1月下旬および2月下旬において他の2品種と比較して多く、TSCは1月下旬において、‘メイヴ’が他の2品種と比較して少ない傾向にあった。

越冬芽のラフィノースおよびスタキオース含量は、‘清舞’ではラフィノースは10月上旬から11月上旬にかけて、スタキオースでは10月上旬から12月下旬にかけて増加し、その後、両可溶性炭水化物とも、2月下旬から4月上旬にかけて減少傾向を示した (Fig. 11 D, E)。‘メイヴ’ではラフィノースが10月上旬から11月上旬にかけて増加し、12月下旬にかけて減少した。‘メイヴ’および‘ピノ・ノワール’のスタキオースならびに‘ピノ・ノワール’のラフィノース含量は全採取時期を通じて有意な季節変動は検出されなかったものの、‘ピノ・ノワール’では両可溶性炭水化物とも1月下旬から4月上旬にかけて減少傾向を示した。品種間で比較すると、ラフィノースは12月下旬以降、‘メイヴ’が他の2品種よりも少ない傾向を示した。スタキオースは‘清舞’が多くの時期において‘メイヴ’より多かった。

越冬芽のデンプン含量は、‘清舞’および‘ピノ・ノワール’では有意な季節変動はみられなかった一方、‘メイヴ’では11月上旬から12月下旬にかけて増加した (Fig. 11 G)。品種間で比較すると、10月上旬から11月上旬の低温馴化期において、‘メイヴ’が他の2品種よりも少ない傾向を示した。

当年生枝のフルクトース含量は、‘清舞’では10月上旬から1月下旬にかけて増加し、4月上旬にかけて減少した (Fig. 12 A)。一方、‘メイヴ’および‘ピノ・ノワール’では10月上旬から12月下旬にかけて増加し、その後は有意な季節変動は検出されなかったが、‘メイヴ’は漸減傾向を示した。品種間で比較すると、フルクトース含量は12月下旬から2月下旬までは‘メイヴ’が多く、‘ピノ・ノワール’で少なかった。‘清舞’は1月下旬から4月上旬までの脱馴化期に大幅に減少し、1月下旬には‘ピノ・ノワール’より多かったが、4月上旬にはその順位が逆転した。

当年生枝のグルコース含量は、3品種とも10月上旬から12月下旬にかけて増加した後、4月上旬にかけて減少した (Fig. 12 B)。品種間差はフルクトースと同様の傾向を示した。

当年生枝のスクロース含量は、‘清舞’では10月上旬から12月下旬にかけて増加し、その後1月下旬まで同程度で推移した後、4月上旬にかけて微減傾向を示した (Fig. 12 C)。‘メイヴ’では10月上旬から12月下旬にかけて増加し、1月下旬から2月下旬にかけても増加傾向を示した。‘ピノ・ノワール’では10月上旬から11月上旬にかけて増加傾向を示し、そ

の後1月下旬まで同程度で推移した後、4月上旬にかけても増加傾向を示した。品種間で比較すると、冬季には‘清舞’および‘メイヴ’で多く、‘ピノ・ノワール’で少なかった。

当年生枝のラフィノース含量は、‘清舞’および‘メイヴ’では10月上旬から12月下旬にかけて、‘ピノ・ノワール’では10月上旬から11月上旬にかけて増加した (Fig. 12 D)。その後、‘清舞’および‘ピノ・ノワール’では4月上旬まで大きな季節変動はみられず、同程度の値で推移した。‘メイヴ’では1月下旬から2月下旬にかけて微増傾向を示した。品種間で比較すると、ラフィノース含量は12月下旬、1月下旬、および4月上旬では‘清舞’が多く、‘ピノ・ノワール’で少ない傾向を示した。

当年生枝のスタキオース含量は、‘清舞’では10月上旬から11月上旬にかけて、‘メイヴ’では10月上旬から12月下旬にかけて増加し、その後は有意な季節変動はみられなかった (Fig. 12 E) 。‘ピノ・ノワール’では全期間を通じて有意な季節変動はみられなかった。スタキオース含量は10月上旬から11月上旬の低温馴化期のみ品種間差がみられ、‘メイヴ’で低かった。

当年生枝のTSC含量は、‘清舞’および‘メイヴ’では10月上旬から12月下旬にかけて、‘ピノ・ノワール’では10月上旬から11月上旬にかけて増加した (Fig. 12 F)。その後‘ピノ・ノワール’および‘メイヴ’では有意な季節変動はみられなかった一方、‘清舞’では1月下旬から4月上旬にかけて減少した。品種間で比較すると、冬季において‘清舞’および‘メイヴ’で多く、‘ピノ・ノワール’で少なかった。

当年生枝のデンプン含量は、‘清舞’および‘メイヴ’では10月上旬から1月下旬にかけて減少傾向にあり、‘ピノ・ノワール’では10月上旬から12月下旬にかけて有意に減少した (Fig. 12 G)。いずれの採取時期においても品種間差は検出されなかった。

2-3-3-5. 越冬芽および当年生枝のアミノ酸の季節変動および品種間差

越冬芽で検出された19種類のアミノ酸およびその総量のうち、多くのアミノ酸について有意な季節変動は検出されなかったが、特に‘清舞’においてアラニン、グルタミン酸、ヒスチジン、リシンおよびフェニルアラニン含量が2月下旬から4月上旬にかけて増加傾向を示した (Fig. 13)。最も顕著な季節変動がみられたのはアルギニンであり、‘清舞’では10月上旬から1月下旬にかけて、‘ピノ・ノワール’では10月上旬から12月下旬にかけて増加し、その後4月上旬にかけて減少傾向を示した。

当年生枝のアミノ酸は品種によって異なる季節変動を示した (Fig. 14)。すなわち、‘メイ

ヴ’ではアラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシンおよびメチオニンは、1 月下旬から 2 月下旬にかけて減少した。‘ピノ・ノワール’および‘清舞’では、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、およびトレオニンが 10 月上旬から 11 月上旬にかけて増加した後、12 月下旬にかけて減少傾向を示した。

2-3-3-6. 越冬芽および当年生枝のフェノール化合物の季節変動および品種間差

本節では越冬芽および当年生枝において、8 種類のフェノール化合物を定量した。越冬芽では、ヴィニフェリン、エピカテキンおよびカテキンが多く含まれており、当年生枝ではヴィニフェリンが他のフェノール化合物と比較して多かった (Fig. 15, 16)。

越冬芽において、‘清舞’では、カテキン、エピカテキン、プロシアニジン二量体、プロシアニジン三量体およびレスベラトロールが 10 月上旬から 11 月上旬にかけて減少傾向を示し、その後 1 月下旬にかけて増加傾向を示した後、4 月上旬にかけて再度減少傾向を示した (Fig. 15)。ヴィニフェリンは、12 月下旬から 2 月下旬にかけて増加傾向を示し、4 月上旬にかけて減少傾向を示した。‘メイヴ’ではレスベラトロールが 11 月上旬から 2 月下旬にかけて増加した。‘ピノ・ノワール’ではいずれの化合物についても採取時期を通じて明瞭な変動は認められなかった。品種間で比較すると、カテキン、エピカテキン、プロシアニジン二量体、プロシアニジン三量体およびヴィニフェリンは‘清舞’で多い傾向にあり、ケルセチンは‘ピノ・ノワール’で多い傾向であった。

当年生枝において、‘清舞’ではカテキン、エピカテキン、プロシアニジン二量体およびプロシアニジン三量体は 10 月上旬から 11 月上旬にかけて減少傾向を示した (Fig. 16)。2 月下旬から 4 月上旬にかけてカテキンおよびケルセチンは増加傾向を示した一方で、エピカテキンは減少傾向を示した。ヴィニフェリンは 11 月上旬から 12 月下旬にかけて増加し、その後減少した。また、ヴィニフェリンが 12 月下旬および 2 月下旬の冬季において、他の 2 品種よりも多い傾向を示した。‘ピノ・ノワール’は当年生枝に含まれるいくつかのフェノール化合物において、2 月下旬から 4 月上旬にかけて‘清舞’と逆の季節変動を示し、カテキンおよびケルセチンは減少した一方、エピカテキンは増加した。11 月上旬から 12 月下旬まではレスベラトロールが、11 月上旬から 2 月下旬まではカテキンが他の 2 品種よりも多い傾向にあった。

2-3-3-7. ブドウ 3 品種の耐凍性と、含水率および組織内成分との関連

越冬芽における耐凍性と含水率および組織内成分とのピアソンの相関分析を示した (Table 14)。越冬芽の LT₅₀ および LTE と、含水率との間には、いずれの品種においても強い正の相関がみられた。すなわち、含水率が低いほど、耐凍性が高い傾向を示した。越冬芽のフルクトースおよびグルコースおよび TSC 含量は、越冬芽の LT₅₀ および LTE との間に強い負の相関を示し、越冬芽ではこれらの糖が多いほど耐凍性が高い傾向を示した。スクロースは、LT₅₀ との間には‘清舞’において、LTE ではすべての品種において負の相関がみられた。デンプンと LT₅₀ および LTE との間には、‘清舞’では正の相関が、‘メイヴ’では負の相関がみられた。‘清舞’はフルクトース、スクロースおよび TSC において、他の 2 品種よりも強い負の相関を示した。越冬芽のアルギニンは LT₅₀ および LTE との間に負の相関を示したが、‘ピノ・ノワール’は他の 2 品種よりも相関が弱かった。ヒスチジンおよびトリプトファンは、‘清舞’および‘メイヴ’において LT₅₀ および LTE との間に負の相関を示した。トレオニンおよびバリンは、‘清舞’および‘ピノ・ノワール’において、LT₅₀ および LTE との間に正の相関を示した。越冬芽のエピカテキンは、‘ピノ・ノワール’において LTE との間に、負の相関を示した。レスベラトロールは、‘メイヴ’および‘ピノ・ノワール’において、LT₅₀ および LTE との間に負の相関を示した。

当年生枝における耐凍性と含水率および組織内成分とのピアソンの相関分析を示した (Table 15)。当年生枝の含水率およびデンプン含量は、LT₅₀ との間にいずれの品種においても強い正の相関を示した。可溶性炭水化物は、‘ピノ・ノワール’におけるスクロースおよびスタキオースを除いて、いずれの糖種においても、LT₅₀ との間に強い負の相関を示した。当年生枝のアミノ酸のうち、アルギニン、アスパラギンおよびトリプトファンは、‘清舞’および‘ピノ・ノワール’において、LT₅₀ との間に負の相関を示した。アラニン、アスパラギン酸およびメチオニンはいずれの品種においても、LT₅₀ との間に正の相関を示した。グリシンは‘清舞’および‘メイヴ’において、フェニルアラニンおよびプロリンは‘清舞’および‘ピノ・ノワール’において、バリンは‘清舞’において正の相関を示した。フェノール化合物においては、エピカテキンは 3 品種において、レスベラトロールは‘清舞’および‘ピノ・ノワール’において、ヴィニフェリンは‘メイヴ’および‘ピノ・ノワール’において LT₅₀ との間に負の相関を示した。一方、カテキンは‘清舞’および‘ピノ・ノワール’において、ケルセチンは‘清舞’および‘メイヴ’において LT₅₀ との間に正の相関を示した。

2-3-4. 考察

2-3-4-1. 越冬芽および当年生枝における耐凍性評価方法

本節では、ブドウ越冬芽および当年生枝の耐凍性を、示差熱分析と電解質漏出法の2つの手法により評価した (Table 12)。越冬芽では明瞭な LTE が検出された一方で、当年生枝では明確な LTE は認められなかった (Fig. 9)。先行研究においても、ブドウの当年生枝における LTE の同定は困難であり、示差熱分析のみで耐凍性を評価することには限界があることが指摘されている (Jun et al., 2021; Mills et al., 2006)。この違いには、越冬芽と当年生枝の越冬戦略の相違が関与すると考えられる。すなわち、ブドウ越冬芽においては、氷点下を下回ると、過冷却および凍結脱水により耐凍性を確保する一方、当年生枝は主として細胞外凍結によって凍害を回避する (Horiuchi et al., 2021; Kasuga et al., 2020)。越冬芽では過冷却打破温度を下回ると原基組織の細胞が一斉に細胞内凍結を起こし、その際に多量の潜熱が急激に放出される。これに対し、当年生枝では細胞内凍結が細胞単位で進行するため、放出される潜熱は小さく検出されにくい (Mills et al., 2006)。以上のことから、ブドウ越冬芽と当年生枝の耐凍性を正確に評価するためには、単一の手法では不十分であり、示差熱分析と電解質漏出法を併用するなど、複数の手法を組み合わせた総合的評価が必要であると考えられる。

示差熱分析により得られた LTE の値と電解質漏出法により得られた LT_{50} の値の間には、数度から十数度程度の差が認められた (Table 12)。この差異については先行研究においても同様に報告されている (Horiuchi et al., 2021)。本節ではこの差の要因を明らかにするため、異なる低温条件における越冬芽の組織構造を Cryo-SEM を用いて観察した。その結果、 -25°C まで冷却した‘ピノ・ノワール’において細胞内凍結が観察され、示差熱分析で検出された LTE の結果を支持する所見が得られた (Table 12; Fig. 10)。LTE と LT_{50} に差が出る要因として、先行研究では、原基組織と頂端分裂組織の低温感受性の違いに加え、電解質漏出法における生存率測定のタイミングが冷却直後と一致しないことが可能性として指摘されている (Horiuchi et al., 2021)。さらに、電解質漏出法による耐凍性評価は、冷却速度や各温度帯における平衡時間などの条件設定に大きく影響を受け、ブドウ越冬芽の耐凍性を過大評価する可能性が指摘されている (Jun et al., 2021, 2024)。加えて、本研究では、示差熱分析が試料の実測温度を基準としたのに対し、電解質漏出法ではプログラムフリーザーの庫内温度を基準として評価したことから、試料温度と庫内温度との間に差が生じ、 LT_{50} の推定値に影響を及ぼした可能性も考えられる。以上のことを踏まえると、電解質漏出法によりブドウ越冬芽の耐凍性を正確に評価するためには、測定条件の校正を行い、耐凍性の過大評価が生じないよ

うにすることが必要となる。また、温度処理後の萌芽率 (Stergios and Howell, 1973) や組織の褐変程度 (Ershadi et al., 2016; Karimi, 2017; Stergios and Howell, 1973) などの生物学的な指標を併せて検証することで、電解質漏出法による LT₅₀ を校正することが重要である。

2-3-4-2. 越冬芽および当年生枝における耐凍性と可溶性炭水化物含量の関連および品種間差

越冬芽および当年生枝の耐凍性には品種間差がみられ、冬季における越冬芽の耐凍性は *V. amurensis* の交配品種である‘清舞’や *V. riparia* の交配品種である‘メイヴ’が高く、一方で‘ピノ・ノワール’を含む *V. vinifera* 品種では低かった (Table 12)。この傾向は本章第 1 節の結果や、ブドウ属交配品種を用いた先行研究との結果とも矛盾しなかった (Grant and Dami, 2015; Karimi et al., 2015; Kovaleski et al., 2019; Table 2; Fig. 16, 17)。越冬芽および当年生枝における含水率は耐凍性と強い関連を示し、いずれの器官においても含水率が低いほど耐凍性が高い傾向が認められた (Table 12, 13)。この結果は本章第 1 節、第 2 節における結果とも一致し (Table 10, 11)、先行研究で報告されている結果とも整合した (Ershadi et al., 2016; Karimi, 2020)。可溶性炭水化物含量については、全ての化合物で越冬芽よりも当年生枝において含量が高く、また耐凍性との関連も強かった (Fig. 11, 12; Table 14, 15)。

越冬芽および当年生枝において、フルクトース、グルコースおよび TSC は測定した全ての品種において秋季から冬季に増加し、耐凍性と強い相関を示した。この結果は前節までの結果および先行研究の結果と一致しており (Ershadi et al., 2016; Jones et al., 1999; Table 14; Fig. 6)、単糖類の蓄積が耐凍性向上に寄与することを強調した。一方、二糖および RFO では品種および器官によって耐凍性との関連が異なった。スクロースは‘清舞’において耐凍性との相関が高かった一方で、‘ピノ・ノワール’では相関が認められなかった。ラフィノースおよびスタキオースと耐凍性との関連には器官間差がみられ、越冬芽では強い相関が認められなかった一方で、当年生枝では‘ピノ・ノワール’のスタキオースを除き、強い相関が認められた。これらのことは先行研究および本章第 2 節の結果と一致し (Jones et al., 1999; Table 11)、可溶性炭水化物の種類によって耐凍性向上への寄与が器官および品種ごとに異なる可能性が示唆された。越冬芽においては特に‘清舞’において、単糖は 1 月以降減少に転じたのに対し、二糖のスクロースでは 1 月下旬から 2 月下旬にかけても微増し、その後減少した (Fig. 11)。これは 1 月下旬から 2 月下旬にかけてラフィノースが減少したことから、その分解産物であるスクロースが増加した可能性が考えられる。デンプン含量は、越冬芽では‘メイヴ’を除き、当年生枝においては全ての品種において 10 月上旬から 12 月下旬にかけて減少し、耐凍性と逆相関した (Fig. 12; Table 15)。特に当年生枝において顕著であったが、こ

れは低温馴化期にデンプンがアミラーゼなどの酵素によって可溶性炭水化物に分解されたためだと考えられる (Koussa et al., 2005)。

本節において高い耐凍性を示した‘メイヴ’の越冬芽において可溶性炭水化物含量は極めて低い値を示し、これは本章第 1 節および第 2 節の結果と矛盾した (Fig. 6, 11, 12; Table 4-9)。本節の実験期間中、特に 2025 年の 2 月では、日最高気温が 10°C を超える日が複数あり、季節外れの高温条件が発生していた (Fig. 8)。この温暖条件によって、‘メイヴ’、‘清舞’および‘清見’では一部の越冬芽が膨らんでいた(データ未取得)。特に 2025 年冬季の‘メイヴ’では採取可能な越冬芽の数が少なく、状態のいい越冬芽は耐凍性試験に供試した。そのため、成分分析に供試された越冬芽は既に品質が低下していたものが多く含まれていた可能性が高い。このことが、本節で得られた可溶性炭水化物含量と耐凍性との矛盾の一因となったと考えられる。

2-3-4-3. 越冬芽および当年生枝における耐凍性とアミノ酸の関連

アミノ酸含量は、特に‘清舞’の越冬芽において、多くの化合物が 2 月下旬から 4 月上旬にかけての昇温に伴い増加した (Fig. 13, 14)。ブドウ越冬芽では、脱馴化時に萌芽に向けてアミノ酸含量が増加することが報告されており、本研究の結果と一致した (Eris, 1982)。一方、先行研究 (Ershadi et al., 2016; Karimi, 2020) において耐凍性との関連が指摘されているプロリンについては、本節では越冬芽では耐凍性との関連が認められず、当年生枝においては寧ろ逆相関を示した (Table 14, 15)。本節において耐凍性との関連が認められたアミノ酸は、越冬芽では‘清舞’におけるアルギニンおよびトリプトファンであり、当年生枝では‘清舞’および‘ピノ・ノワール’におけるアルギニン、トリプトファンおよびアスパラギンであった (Fig. 13, 14; Table 14, 15)。アスパラギンはブドウの当年生枝において低温馴化期に増加することが報告されており (Nassar and Kliewer, 1966)、本研究結果と一致した。木本植物では、アミノ酸含量の季節変動に基づき、冬季に①アルギニンのみ蓄積するタイプ、②プロリンのみ蓄積するタイプ③アルギニンおよびプロリンの両方を蓄積するタイプの 3 つに分類されることが知られている (酒井・吉田, 1983)。また、ブドウは成長期において窒素源としてアルギニンを利用し、当年生枝に多量に蓄積することが報告されている (Kliewer and Cook, 1971)。これらの知見と本節の結果を踏まえると、ブドウは冬季にアルギニンを蓄積するタイプに属する可能性が示唆される。ただし、本節の結果は単年度試験に基づくため、今後は複数年にわたる反復試験を行い、アルギニンの季節変動と耐凍性との関連をさらに精査する必要がある。越冬芽におけるアスパラギン酸含量は、‘ピノ・ノワール’では 10 月から 12 月にかけて減少傾向を示した一方で、‘清舞’においては同時期に増加傾向を示した。また、トリプ

トファン含量は実験期間を通じて‘ピノ・ノワール’が‘清舞’よりも多かった (Fig. 13)。先行研究において、*V. vinifera* 品種である‘Jingzaojing’では低温馴化期において越冬芽のアスパラギン酸が減少するのに対し、*V. amurensis* 品種の‘Zuoshan-1’では増加し、また‘Jingzaojing’の方が‘Zuoshan-1’よりもトリプトファンが多いことが報告されており (Li et al., 2024)、本研究の結果と矛盾しなかった。

2-3-4-4. 越冬芽および当年生枝における耐凍性とフェノール化合物の関連

フェノール化合物は、越冬芽では‘ピノ・ノワール’におけるエピカテキンおよびレスベラトロールが、当年生枝ではこれら2種類に加えてヴィニフェリンもいくつかの品種で耐凍性との関連を示した (Fig. 15, 16; Table 14,15)。

エピカテキンはフラボノイド類に属する化合物であり、フラボノイドは多くの植物において抗酸化物質として機能し、低温ストレスに伴い発生する活性酸素種 (ROS) を除去し、酸化ストレスを軽減に寄与することが知られている (Li et al., 2025)。さらに、フラボノイドはシグナル伝達物質としても機能し、低温応答 (COR) 遺伝子について、転写活性化やタンパク質修飾など、多段階で遺伝子発現を調整することが報告されている (Ithal and Reddy, 2004; Schulz et al., 2015)。また、シャクナゲおよびオリーブの葉では、冬季にフラボノイド生合成が亢進し、含量が増加することが報告されている (Al-Saif et al., 2024; Swiderski et al., 2004)。

ポリフェノールの中には、深過冷却を行うカツラ (*C. japonicum*) の木部柔細胞から発見されたように、氷核形成阻害効果を持つものが存在する (Kasuga et al., 2008)。さらにエピカテキンは、ヨウ化銀に対しては強い氷核形成阻害効果を持つ一方で、空気由来の氷核には強い氷核形成促進効果を持つという、二面的な性質を持つことが報告されている (Kuwabara et al., 2013)。本研究の結果とこれらの報告を踏まえると、ブドウ越冬芽および当年生枝に含まれる氷核の様態により、以下の2つの仮説が考えられる。①エピカテキンが氷核形成を阻害し、過冷却状態を維持することで、耐凍性が向上する②エピカテキンが氷核形成を促進し、より高い温度で細胞外 (または器官外) 凍結を誘導し、凍結脱水を緩やかにすることで耐凍性が向上する。これらの仮説の検証には、今後の実験的アプローチが必要である。

レスベラトロールについては、*V. amurensis* の幼苗を用いた研究で、低温馴化に伴い葉におけるレスベラトロール合成酵素の一種であるスチルベン合成酵素遺伝子 (STS) が誘導されることが報告されている (Xin et al., 2013)。しかし、*V. amurensis* 由来の STS 遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、 -10°C の低温における生存率は

改善せず (Ogneva et al., 2021)、シロイヌナズナにレスベラトロールを外与しても、耐凍性は向上せずむしろ低下傾向を示したことが報告されている (Aleynova et al., 2024)。これらの結果は、レスベラトロールが耐凍性向上に直接的な寄与をしない可能性を示唆するが、本研究で観察されたように低温馴化期に当年生枝で増加することから、間接的に耐凍性に影響を及ぼす可能性は否定できない。

ϵ -ヴィニフェリンはレスベラトロールの二量体であり、収穫直後の *V. vinifera* の果実においてはほとんど含まれないものの、0°C の低温処理によって STS 遺伝子の発現上昇とともに増加することが報告されている (Maoz et al., 2019)。また、厳冬期に *V. vinifera* の越冬芽に含まれる ϵ -ヴィニフェリンを測定した研究では、3 カ年の年次反復のうち、最も気温の低い年に含量が高かったことが示されており (Daskalakis et al., 2021)、低温への応答性が示唆される。

本節ではブドウ越冬芽および当年生枝において、エピカテキン、レスベラトロールおよび ϵ -ヴィニフェリンと耐凍性との関連を示した (Table 14, 15)。しかし、これらのフェノール化合物が耐凍性向上にどの程度寄与しているのか、またその機序が抗酸化作用・氷核形成制御・低温応答遺伝子の制御などの、どの機能に起因するのかについては現時点では明確ではない。今後はこれらの化合物の機能解析や代謝追跡、さらには遺伝子発現との統合解析を通じて、耐凍性の向上との因果関係を詳細に検討する必要がある。

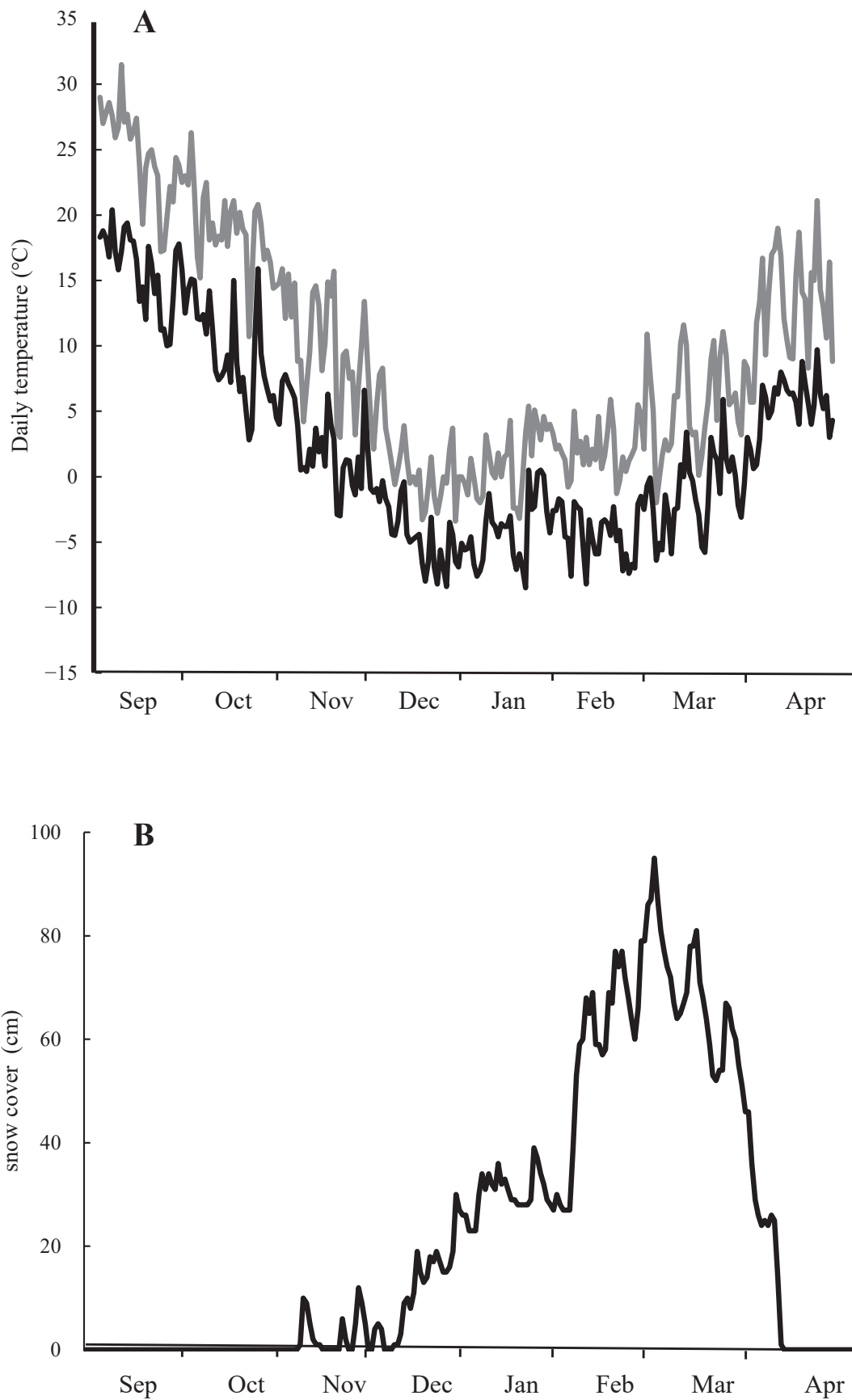


Fig. 8. (A) Change in the daily minimum (black line) and maximum (gray line) air temperature and (B) snow cover during experimental period (October 2024 to April 2025).

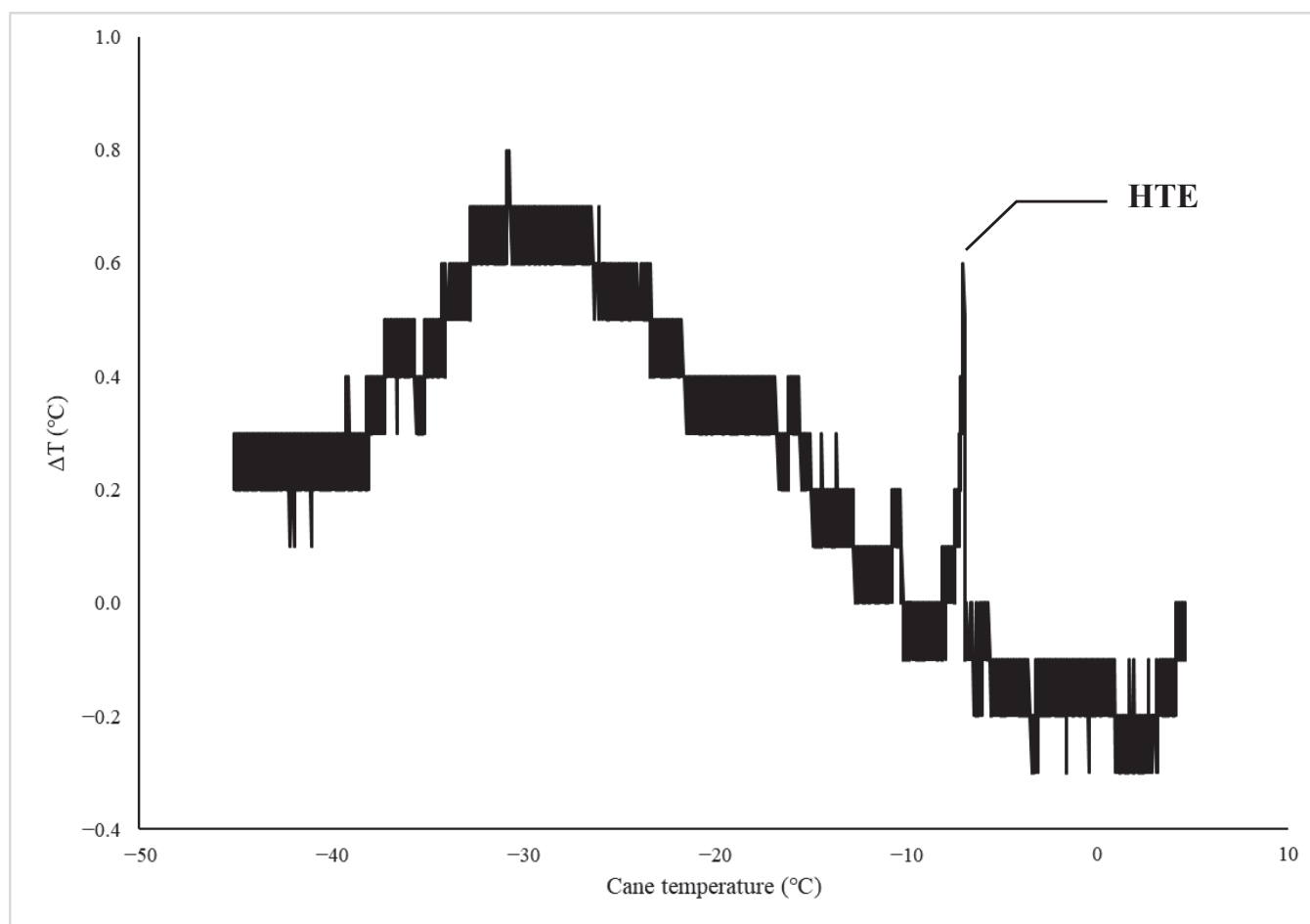


Fig. 9. A typical profile of the differential thermal analysis (DTA) of grapevine cane. The peak indicates HTE (high temperature exotherm). ΔT represents difference between the temperature from the fresh and dried samples.

Table 12. Seasonal changes and cultivar differences in freezing resistance of bud (A), (B) and cane (C) in seven grapevine cultivars.

(A) Bud LTE (°C)						
	2024/10/11	2024/11/11	2024/12/21	2025/1/24	2025/2/26	2025/4/5
Delaware	-9.1 ± 0.46	-14.7 ± 0.24	-25.4 ± 0.27 a	-26.6 ± 0.67 ab	-25.3 ± 1.07 ab	-19.6 ± 0.60
Kerner	-10.1 ± 0.45	-15.6 ± 1.22	-21.2 ± 1.11 c	-22.7 ± 0.46 c	-23.0 ± 0.31 b	-20.5 ± 0.35
Kiyomai	-7.5 ± 0.36	-14.6 ± 0.24	-26.9 ± 0.83 a	-27.1 ± 0.37 a	-26.8 ± 0.50 a	-18.0 ± 0.79
Kiyomi	-9.0 ± 0.63 ns	-15.4 ± 0.24 ns	-24.3 ± 0.63 ab	-23.4 ± 1.28 bc	-25.8 ± 0.28 ab	-20.0 ± 0.65 ns
Maeve	-8.1 ± 0.89	-14.6 ± 0.80	-24.4 ± 0.19 ab	-26.2 ± 0.23 ab	-27.7 ± 1.39 a	– –
Pinot noir	-9.7 ± 0.50	-16.0 ± 0.15	-21.9 ± 0.28 bc	-23.6 ± 0.53 bc	-22.9 ± 0.51 b	-20.9 ± 0.32
Sauvignon blanc	-9.3 ± 0.58	-15.1 ± 0.28	-21.6 ± 0.12 bc	-22.3 ± 0.69 c	-22.9 ± 0.38 b	-18.0 ± 1.02

(B) Bud LT ₅₀ (°C)						
	2024/10/11	2024/11/11	2024/12/21	2025/1/24	2025/2/26	2025/4/5
Delaware	-13.0 ± 1.89	-17.4 ± 1.16 b	-38.9 ± 0.67 b	-42.6 ± 1.60 b	-30.7 ± 3.90 ab	-27.6 ± 0.27 a
Kerner	-14.9 ± 0.76	-22.3 ± 0.84 ab	-27.6 ± 2.57 c	-27.2 ± 1.05 c	-29.1 ± 1.87 ab	-24.7 ± 2.28 a
Kiyomai	-12.7 ± 0.19	-18.6 ± 1.15 ab	-48.2 ± 0.29 a	-41.7 ± 0.92 b	-30.6 ± 1.29 ab	-13.1 ± 1.55 b
Kiyomi	-11.7 ± 0.58 ns	-21.0 ± 2.56 ab	-38.0 ± 1.18 b	-49.1 ± 0.75 a	-38.7 ± 1.58 ab	-27.0 ± 3.30 a
Maeve	-13.0 ± 0.94	-25.3 ± 1.25 a	-46.7 ± 1.27 a	-44.5 ± 0.55 ab	-40.1 ± 2.49 a	– –
Pinot noir	-13.9 ± 0.73	-19.6 ± 1.27 ab	-30.8 ± 1.65 c	-29.9 ± 1.91 c	-28.7 ± 0.52 ab	-26.2 ± 0.58 a
Sauvignon blanc	-15.0 ± 1.04	-18.9 ± 0.68 ab	-29.1 ± 1.12 c	-29.3 ± 1.93 c	-28.3 ± 3.45 b	-21.4 ± 1.47 ab

(B) Cane LT ₅₀ (°C)						
	2024/10/11	2024/11/11	2024/12/21	2025/1/24	2025/2/26	2025/4/5
Delaware	-17.7 ± 0.57	-25.3 ± 2.66 ab	-34.6 ± 0.16 bc	-34.5 ± 0.35 c	-29.8 ± 0.35 b	-18.8 ± 0.61 d
Kerner	-17.3 ± 0.11	-22.0 ± 0.09 ab	-29.7 ± 1.02 d	-28.6 ± 0.84 d	-29.3 ± 0.16 b	-25.8 ± 0.07 c
Kiyomai	-16.9 ± 0.41	-24.5 ± 1.29 ab	-38.9 ± 1.68 b	-38.4 ± 1.27 b	-37.0 ± 0.99 a	-25.9 ± 0.44 c
Kiyomi	-16.1 ± 0.95 ns	-28.9 ± 2.11 a	-44.0 ± 0.80 a	-43.7 ± 0.81 a	-41.5 ± 0.82 a	-30.4 ± 0.35 a
Maeve	-17.1 ± 0.42	-21.6 ± 1.61 ab	-34.3 ± 0.76 c	-34.7 ± 0.91 c	-31.3 ± 1.67 b	– –
Pinot noir	-16.3 ± 0.37	-22.3 ± 0.45 ab	-30.5 ± 0.94 cd	-28.1 ± 0.46 d	-30.7 ± 0.18 b	-26.7 ± 0.32 bc
Sauvignon blanc	-15.9 ± 0.48	-20.8 ± 0.94 b	-28.8 ± 0.58 d	-26.8 ± 0.23 d	-27.0 ± 1.78 b	-28.1 ± 0.35 b

Data represents mean value ± S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.
– indicates not measured.

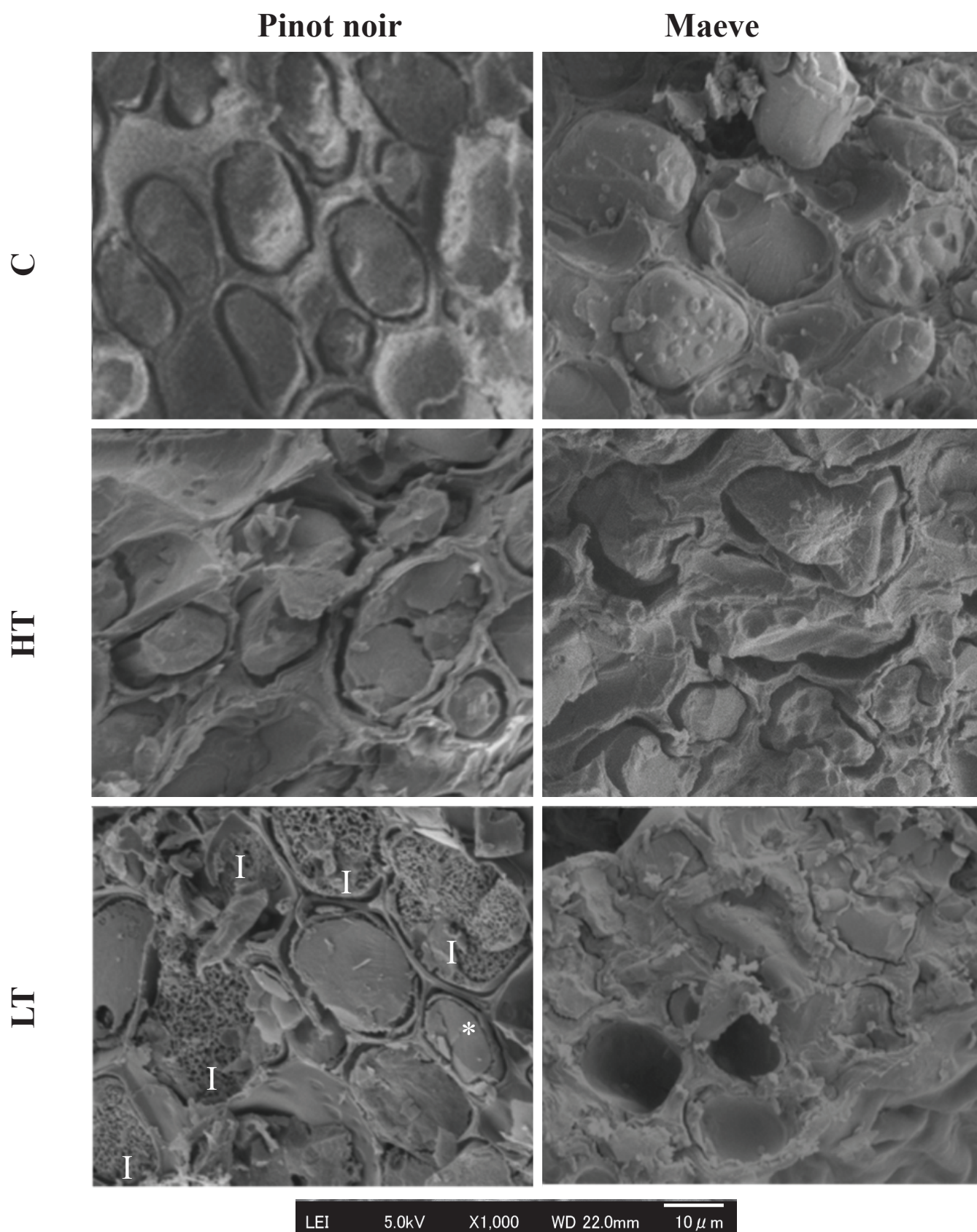


Fig. 10. Cryo-SEM images of bud primordia cells in ‘Pinot noir’ (left) and ‘Maeve’ (right). C: no cooling treatment, HT: slow cooling to -20°C , LT: slow cooling to -25°C . Bar = $10\text{ }\mu\text{m}$. I; intracellular freezing, * cells with indistinct organelles.

Table 13. Seasonal changes and cultivar differences in water content of buds (A) and canes (B) in seven grapevine cultivars.

(A) Bud Water Content (%)						
	2024/10/11	2024/11/11	2024/12/21	2025/1/24	2025/2/26	2025/4/5
Delaware	50.0 ± 0.77 abc	45.5 ± 3.47	37.5 ± 1.98	40.5 ± 0.52 ab	42.4 ± 1.17 a	40.6 ± 0.90
Kerner	49.1 ± 1.33 bc	44.4 ± 1.54	40.3 ± 0.47	43.1 ± 2.20 a	38.6 ± 1.64 ab	41.5 ± 1.15
Kiyomai	53.8 ± 0.88 ab	45.4 ± 1.80	39.3 ± 0.56	39.7 ± 1.28 ab	41.8 ± 0.60 ab	40.7 ± 1.68
Kiyomi	44.6 ± 1.13 c	43.3 ± 1.32 ns	37.8 ± 1.18 ns	39.0 ± 1.31 ab	36.4 ± 1.51 ab	41.6 ± 0.63 ns
Maeve	49.4 ± 1.06 abc	39.8 ± 3.85	36.3 ± 2.06	33.4 ± 3.90 b	31.3 ± 1.62 b	– –
Pinot noir	52.9 ± 3.05 abc	45.4 ± 0.50	40.2 ± 0.67	42.1 ± 0.84 ab	40.7 ± 2.65 ab	37.6 ± 0.66
Sauvignon blanc	58.2 ± 3.01 a	45.6 ± 1.57	39.8 ± 0.60	37.4 ± 1.19 ab	37.4 ± 4.18 ab	41.2 ± 1.67

(B) Cane Water Content (%)						
	2024/10/11	2024/11/11	2024/12/21	2025/1/24	2025/2/26	2025/4/5
Delaware	44.8 ± 0.13 c	47.3 ± 1.18 bc	42.2 ± 0.84 b	42.3 ± 0.60 ab	42.7 ± 0.34 ab	42.9 ± 1.11 b
Kerner	51.3 ± 0.14 abc	52.3 ± 1.15 ab	47.4 ± 0.67 ab	45.9 ± 2.86 a	44.2 ± 1.19 a	45.9 ± 0.55 b
Kiyomai	48.9 ± 0.88 bc	46.9 ± 0.64 bc	42.3 ± 2.04 b	43.2 ± 1.13 ab	42.6 ± 0.92 ab	42.4 ± 0.66 b
Kiyomi	49.0 ± 0.89 bc	46.7 ± 0.98 bc	45.4 ± 0.87 ab	43.6 ± 1.23 ab	42.5 ± 0.63 ab	46.7 ± 0.24 ab
Maeve	52.1 ± 2.36 abc	45.7 ± 2.55 c	45.8 ± 0.33 ab	36.7 ± 2.91 b	38.2 ± 1.10 b	– –
Pinot noir	54.0 ± 1.75 ab	54.6 ± 0.93 a	47.1 ± 1.35 ab	45.2 ± 0.61 a	45.2 ± 0.09 a	44.0 ± 2.57 b
Sauvignon blanc	58.2 ± 2.88 a	52.1 ± 1.24 abc	49.1 ± 0.50 a	45.8 ± 0.34 a	41.4 ± 2.16 ab	52.2 ± 0.30 a

Data represents mean value ± S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.
 – indicates not measured.

● Kiyomai ▲ Maeve ■ Pinot noir

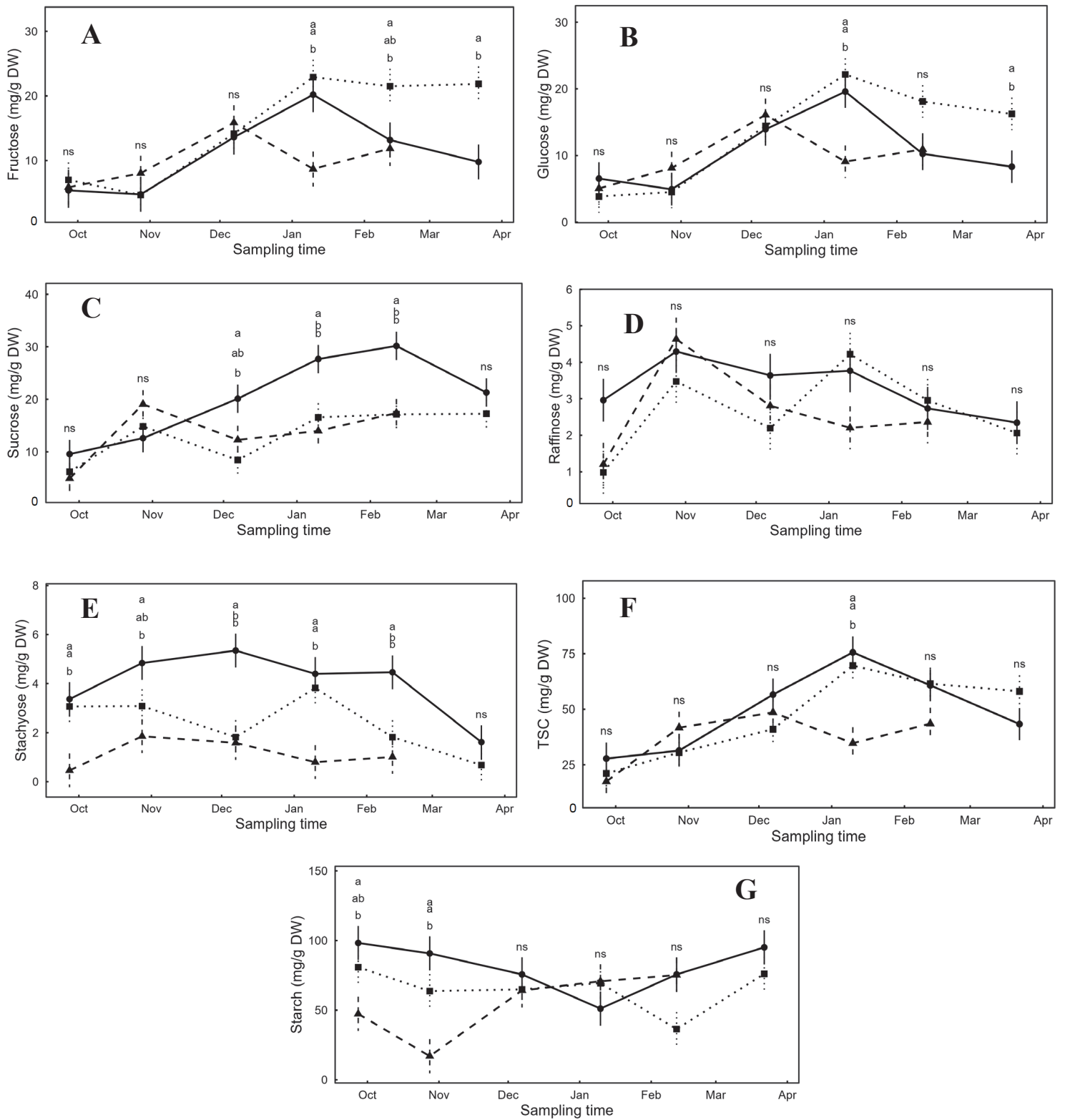


Fig. 11. Seasonal changes and cultivar differences of soluble carbohydrates in buds; (A) Fructose, (B) Glucose, (C) Sucrose, (D) Raffinose, (E) Stachyose, (F) TSC and (G) starch. Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

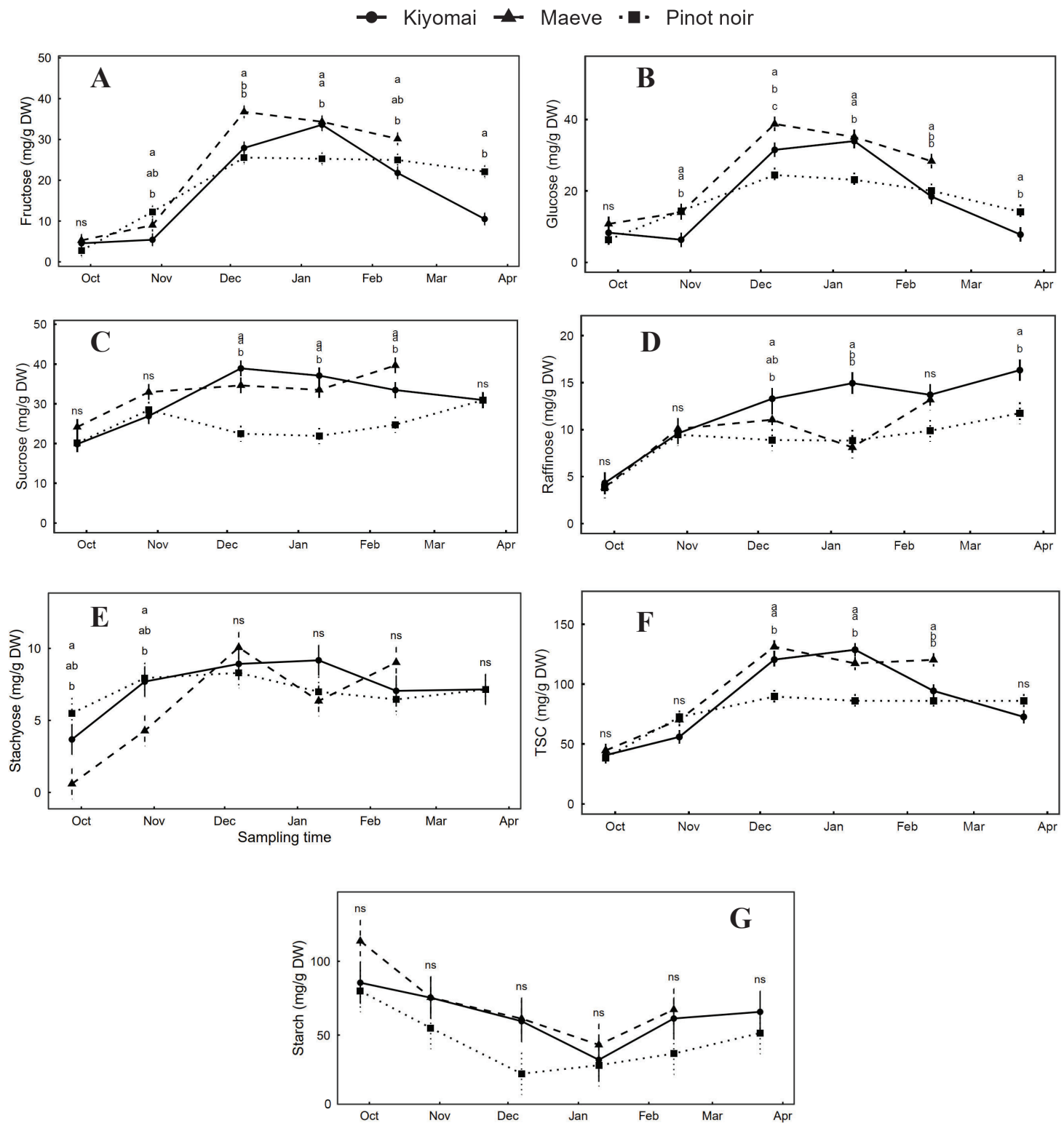


Fig. 12. Seasonal changes and cultivar differences of soluble carbohydrates in canes; (A) Fructose, (B) Glucose, (C) Sucrose, (D) Raffinose, (E) Stachyose, (F) TSC and (G) starch. Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

● Kiyomai ▲ Maeve ■ Pinot noir

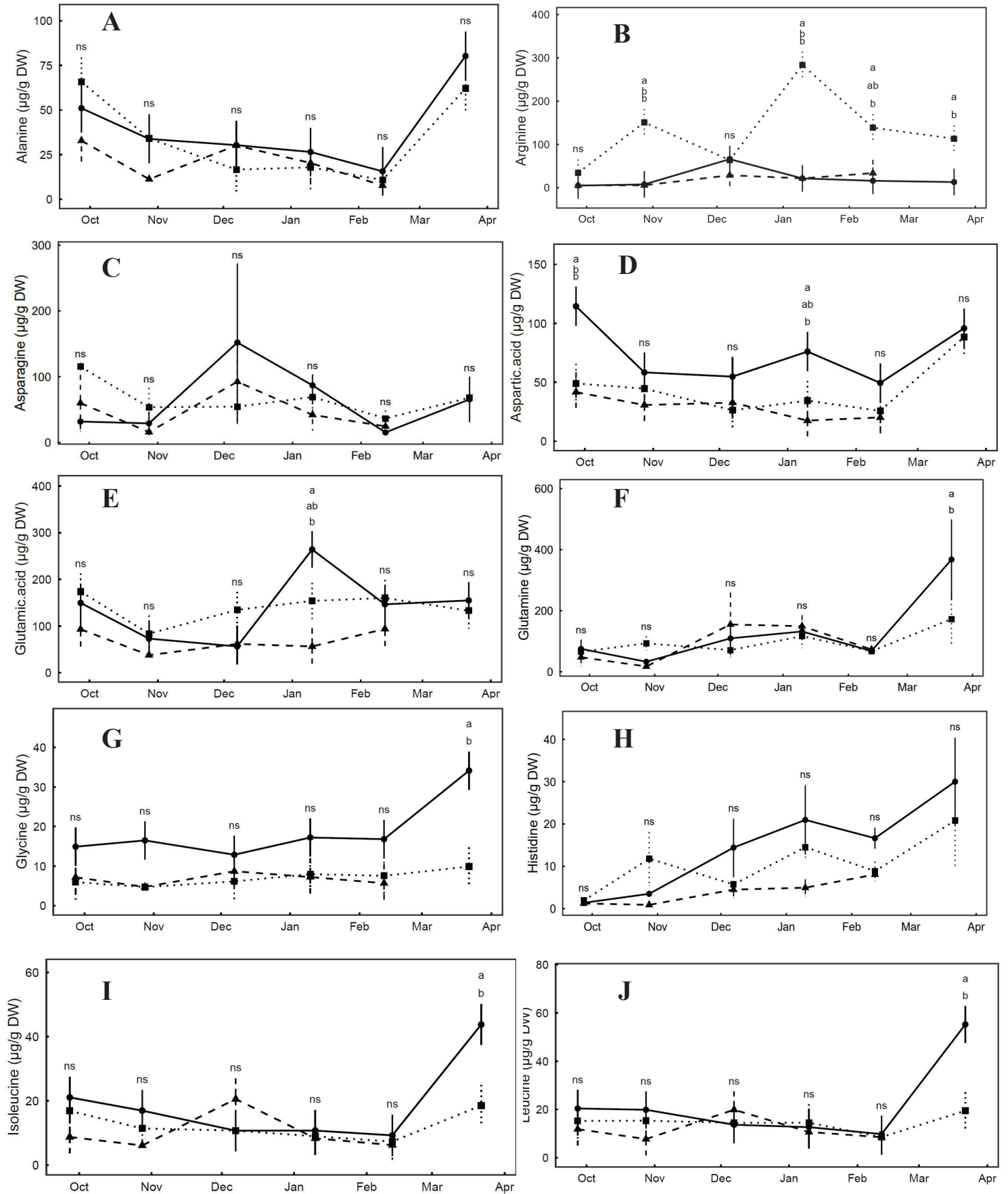


Fig. 13 Cultivar differences and seasonal variation of amino acids in buds.

(A) Alanine, (B) Arginine, (C) Asparagine, (D) Aspartic Acid, (E) Glutamic Acid, (F) Glutamine, (G) Glycine, (H) Histidine, (I) Isoleucine, and (J) Leucine.

Data represents mean value $\pm$ S.E. ($n = 3$). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

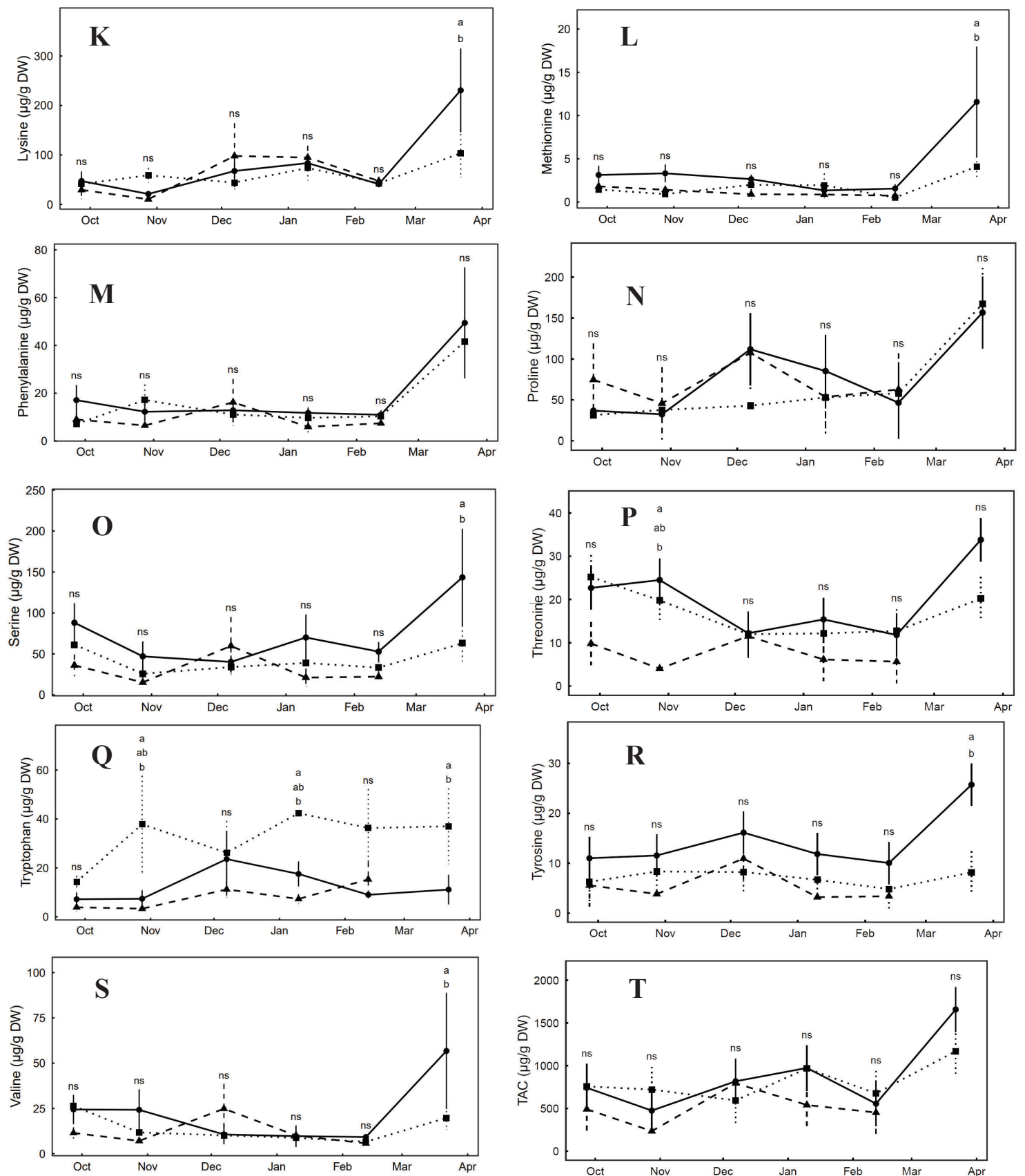


Fig. 13 (continued). Cultivar differences and seasonal variation of amino acids in buds.

(K) Lysine, (L) Methionine, (M) Phenylalanine, (N) Proline, (O) Serine, (P) Threonine, (Q) Tryptophan, (R) Tyrosine, (S) Valine, and (T) Total amino acid (TAC).

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

● Kiyomai ▲ Maeve ■ Pinot noir

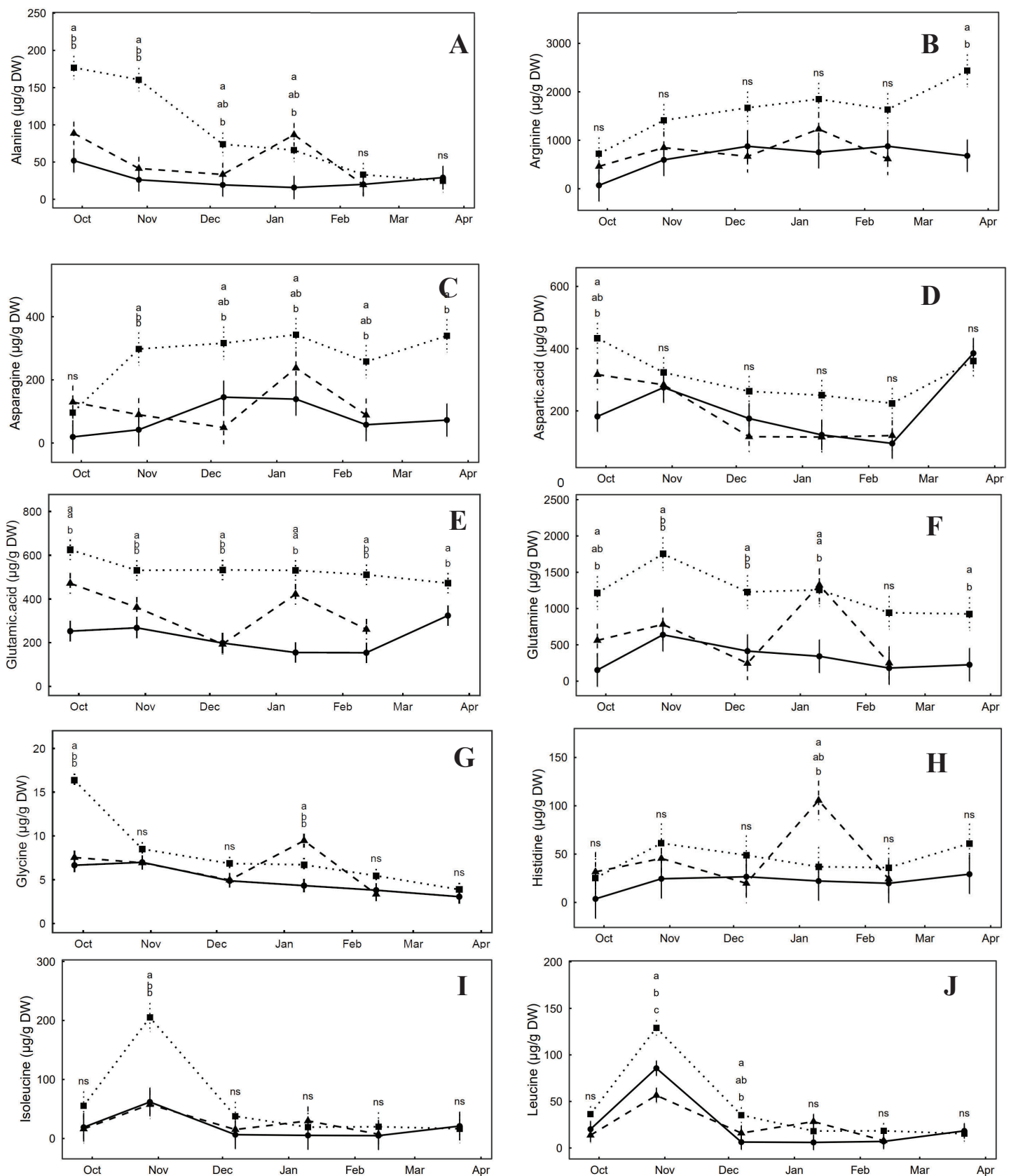


Fig. 14 Cultivar differences and seasonal variation of amino acids in canes.

(A) Alanine, (B) Arginine, (C) Asparagine, (D) Aspartic Acid, (E) Glutamic Acid, (F) Glutamine, (G) Glycine, (H) Histidine, (I) Isoleucine, and (J) Leucine.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

● Kiyomai ▲ Maeve ■ Pinot noir

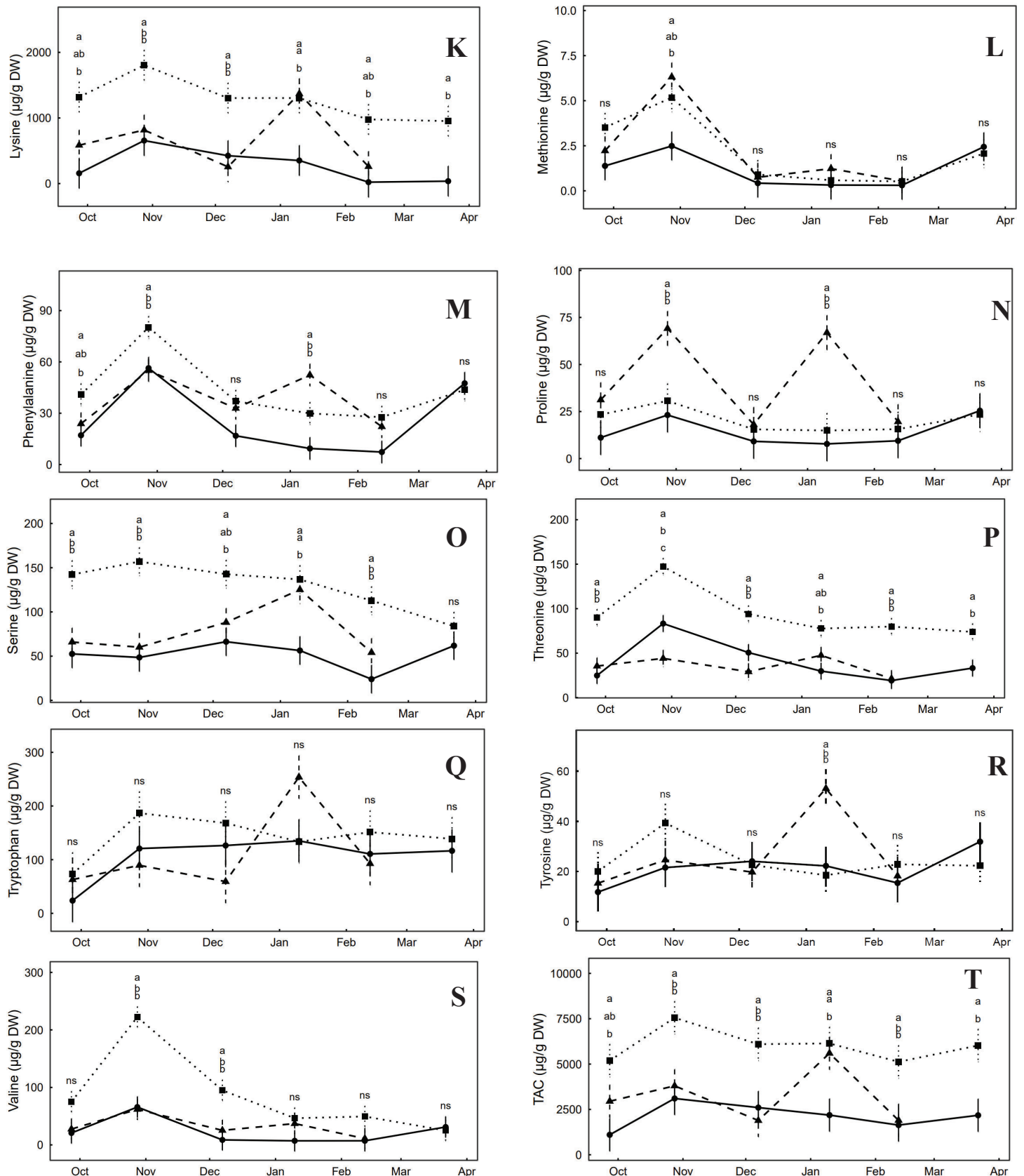


Fig. 14 (continued). Cultivar differences and seasonal variation of amino acids in canes.

(K) Lysine, (L) Methionine, (M) Phenylalanine, (N) Proline, (O) Serine, (P) Threonine, (Q) Tryptophan, (R) Tyrosine, (S) Valine, and (T) Total amino acid (TAC).

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

● Kiyomai ▲ Maeve ■ Pinot noir

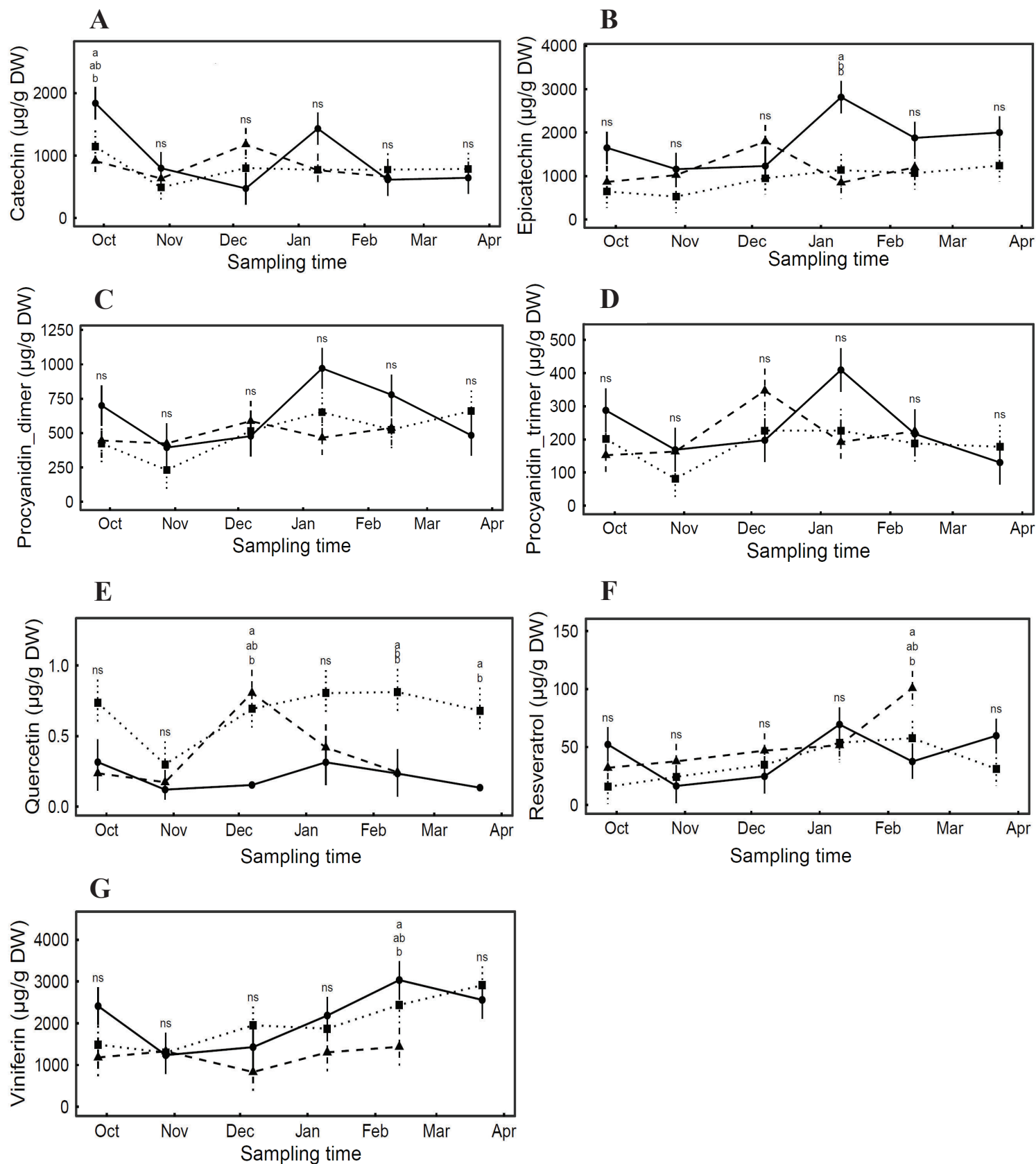


Fig. 15. Cultivar differences and seasonal variation of phenolic compounds in buds.

(A) Catechin, (B) Epicatechin, (C) Procyanidin dimer, (D) Procyanidin trimer, (E) Quercetin, (F) Resveratrol, and (G) Viniferin.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

● Kiyomai ▲ Maeve ■ Pinot noir

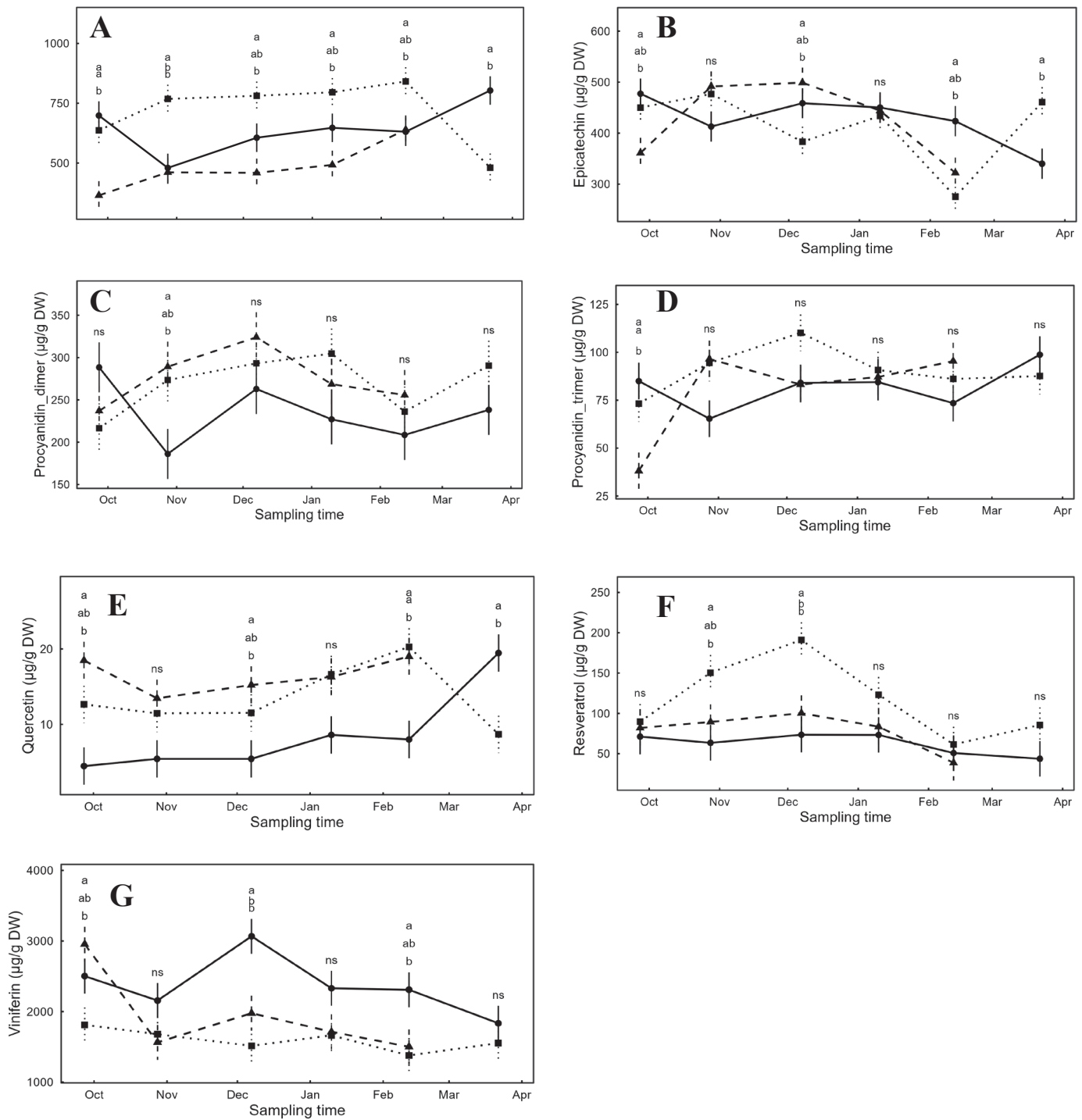


Fig. 16. Cultivar differences and seasonal variation of phenolic compounds in canes.

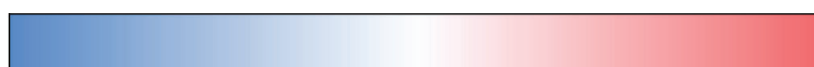
(A) Catechin, (B) Epicatechin, (C) Procyanidin dimer, (D) Procyanidin trimer, (E) Quercetin, (F) Resveratrol, and (G) Viniferin.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3). Different letters indicate significant difference at 5% level among cultivars at the same sampling date in Tukey–Kramer’s test and ns indicates not significant.

Table 14. Pearson correlation coefficients among LTE, LT₅₀ and water content, soluble carbohydrates content, amino acids, and phenolic compounds content in buds of three grapevine cultivars.

	LTE			LT ₅₀		
	Kiyomai	Maeve	Pinot Noir	Kiyomai	Maeve	Pinot Noir
WC	***	***	***	**	***	***
Fructose	***	*	**	**	*	*
Glucose	**	**	***	**	**	**
Sucrose	***	†	†	*	ns	ns
Raffinose	ns	ns	†	ns	ns	ns
Stachyose	ns	ns	ns	*	ns	ns
TSC	***	*	**	***	*	*
Starch	*	**	ns	*	*	ns
Alanine	ns	ns	*	*	ns	†
Arginine	*	*	†	**	*	ns
Asparagine	ns	ns	†	ns	ns	†
Aspartic acid	ns	*	ns	ns	ns	ns
Glutamic acid	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Glutamine	ns	ns	ns	ns	†	ns
Glycine	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Histidine	†	**	ns	ns	*	ns
Isoleucine	ns	ns	ns	*	ns	ns
Leucine	ns	ns	ns	†	ns	ns
Lysine	ns	ns	ns	ns	†	ns
Methionine	ns	*	ns	†	*	ns
Phenylalanine	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Proline	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Serine	ns	ns	ns	†	ns	ns
Threonine	ns	ns	**	*	ns	**
Tryptophan	†	*	ns	*	*	ns
Tyrosine	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Valine	ns	ns	**	*	ns	**
TAC	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Catechin	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Epicatechin	ns	ns	*	ns	ns	ns
Procyanidin trimer	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Procyanidin_dimer	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Quercetin	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Resveratrol	ns	*	*	ns	ns	*
Resveratrol_dimer	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Viniferin	ns	ns	ns	ns	ns	ns

-1



1

***, **, * and † represent significant at 0.1%, 1%, 5% and 10% levels of Pearson's correlation analysis respectively, ns means no significance (n = 6).
TSC: total soluble carbohydrates, TAC: total amino acid content.

Table 15. Pearson correlation coefficients among LT₅₀ and water content, soluble carbohydrates content, amino acids, and phenolic compounds content in canes of three grapevine cultivars.

	Kiyomai	Maeve	Pinot noir
WC	***	**	***
Fructose	***	***	***
Glucose	***	***	***
Sucrose	***	**	ns
Raffinose	**	**	**
Stachyose	***	***	ns
TSC	***	***	***
Starch	*	†	***
Alanine	***	†	***
Arginine	***	ns	*
Asparagine	*	ns	**
Aspartic acid	†	**	*
Glutamic acid	**	*	ns
Glutamine	ns	ns	ns
Glycine	*	ns	***
Histidine	†	ns	ns
Isoleucine	*	ns	ns
Leucine	†	ns	ns
Lysine	ns	ns	ns
Methionine	***	†	**
Phenylalanine	*	ns	†
Proline	*	ns	*
Serine	ns	ns	ns
Threonine	ns	ns	ns
Tryptophan	***	ns	*
Tyrosine	ns	ns	ns
Valine	*	ns	ns
TAC	ns	ns	ns
Catechin	**	ns	***
Epicatechin	†	**	*
Procyanidin dimer	ns	ns	ns
Procyanidin trimer	ns	ns	ns
Quercetin	**	**	ns
Resveratrol	*	ns	*
Resveratrol dimer	ns	ns	ns
Viniferin	ns	*	†

−1



1

***, **, * and † represent significant at 0.1%, 1%, 5% and 10% levels of Pearson's correlation analysis respectively, ns means no significance (n = 6).

TSC: total soluble carbohydrates, TAC: total amino acid content.

第3章 含水量および可溶性炭水化物含量を用いたブドウ越冬芽の耐凍性推定

モデルの構築および検証

3-1. 緒言

近年、地球温暖化傾向が進行しているものの、果樹栽培における凍害リスクは依然として高く、引き続き注意が必要である。気候変動に関する政府間パネル (IPCC, 2022) によると、将来的に気候変動の進行に伴い、晩秋や早春における高温、冬季の異常な低温を含む極端な気象イベントの発生確率が増加することが予測されている。果樹では低温馴化が進むはずの秋に高温条件が続くと、十分な耐凍性を獲得できず、その結果冬季における凍害リスクが高まることが指摘されている (Sakamoto et al., 2017)。

ブドウの凍害防御方法には、アクティブ法とパッシブ法がある (Rahemi et al., 2022)。パッシブ法は、凍害発生前に実施される予防的な方法であり、適切な園地、品種、台木の選択、枝おろしによる覆雪や覆土、適切な栽培管理などが含まれる (Poni et al., 2022; Rahemi et al., 2022; Tsumura et al., 2019; 北海道農政部生産振興局農産振興課, 2022)。一方、アクティブ法は凍害発生の恐れがある状況で、その時点においてピンポイントで実施され、外部から熱を加えるなどして直接的に凍害を防止する方法である。アクティブ法は運用コストが高いため、その実施の判断をするためには、凍害リスク、すなわち最低気温とブドウの耐凍性を予測することが重要となる。ブドウにおいては、最も凍害を受けやすい部位である越冬芽の耐凍性を把握することが特に重要である (Jones et al., 1999)。

これまでに、ブドウ越冬芽の耐凍性予測モデルとして、気温を説明変数としたモデルが多く構築されてきた。2000 年以前には、線形回帰分析や重回帰分析などによる静的モデルが用いられてきたが (Hamman et al., 1996; Proebsting et al., 1980; Wolf and Cook, 1992)、近年では時間経過に伴う耐凍性の動態を表現可能な動的モデルが多数報告されている (Ferguson et al., 2014, 2011; Kovaleski et al., 2023; Londo and Kovaleski, 2025; North et al., 2022; North and Kovaleski, 2024; Wang et al., 2024)。

しかし、気温のみを説明変数とする既存モデルでは、栽培条件の違いに起因する生理的变化を適切に再現できない可能性がある。ブドウは同じ気温の暴露を受けた圃場においても、樹齢 (Kaya et al., 2024)、仕立て方法 (Behrooz et al., 2025)、剪定強度や摘房の程度 (Wilson et al., 2014)、窒素施用量 (Wample et al., 1993) などの栽培管理条件の違いによって、越冬芽

の可溶性炭水化物含量や含水量が変化し、結果として耐凍性の変動することが報告されている。そのため、異なる栽培条件下で耐凍性を精度高く推測するためには、同時期の可溶性炭水化物含量および含水量などの生理学的なパラメーターを考慮する必要がある（Charrier et al., 2013）。ブドウ越冬芽においてそれらのパラメーターが耐凍性を説明する重要な要因であることは、本論文第1章の結果に加え、多くの先行研究の結果から示唆されている（Ershadi et al., 2016; Grant and Dami, 2015; Grant et al., 2009; Jones et al., 1999）。

先行研究においては、クルミ、リンゴ、ナラなどの木本植物を対象に、可溶性炭水化物および含水量を説明変数とした精度の高い耐凍性推定モデルが構築されている（Baffoin et al., 2021; Poirier et al., 2010）。しかし、ブドウにおいてこのような生理学的パラメーターに基づく耐凍性モデルは十分に検討されていない。本節では、これらの先行研究の知見を踏まえ、ブドウ越冬芽の耐凍性を推定するモデルとして、可溶性炭水化物含量および含水量を説明変数とする生理学的パラメーターに基づく耐凍性推定モデルを構築し、その推定精度を検証することを目的とした。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 植物材料、耐凍性および含水量データ

実験材料には前章と同じ、2022/2023 年、2023/2024 年、2024/2025 年の 3 カ年に採取した、*V. vinifera* 品種の‘ピノ・ノワール’の越冬芽を用いた。越冬芽の耐凍性は、第 1 章第 3 節の結果から、示差熱分析による LTE を指標とした。LTE は前章に示した方法により行った。含水量については、乾物 1 g 相当の試料に含まれていた水分含量として、以下の式で算出した。

$$\text{含水量 (g/g DW)} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{DW}}$$

可溶性炭水化物含量については、前章で示した方法により行った。

3-2-2. モデル構築

本節では含水量および可溶性炭水化物を説明変数としてブドウ越冬芽の耐凍性 (LTE) を推定するモデルを R (ver.4.3.1) を用いて構築した。モデルは可溶性炭水化物の取り扱い方の違いにより 4 種類を定義し、Baffoin et al. (2021) の手法に従った 3 つのモデル (JUG, TOT, ISC モデル) に加え、本章において新たに 1 つのモデル (VIT モデル) を構築した。

1 つ目の JUG モデルはクルミ (*Juglans regia*) の耐凍性を予測したモデルであり (Baffoin et al., 2021; Poirier et al., 2010)、クルミの樹体に含まれる可溶性炭水化物のうち含量の多いグルコース、フルクトースおよびスクロースを説明変数とするモデルである。ブドウ越冬芽においてもこれらが可溶性炭水化物の大部分を占めるため (Fig. 19, 20)、本モデルを採用することにした。JUG モデルは次式で表される。

$$LTE = \alpha \times \frac{\ln(\text{GFS})}{\text{WC}} + I$$

ここで、GFS はグルコース、フルクトースおよびスクロースの合計含量、WC は含水量、 α および I は係数で、それぞれ傾きと切片を示す。

2 つ目の TOT (Total soluble carbohydrate) モデルは JUG モデルに類似するが、説明変数として総可溶性炭水化物含量を採用する。すなわち、グルコース、フルクトース、スクロース、ラフィノースおよびスタキオース含量の合計値である TSC (Total soluble carbohydrate) を説

明変数として次式で表される。

$$LTE = \alpha \times \frac{\ln(TSC)}{WC} + I$$

3 つ目の VIT (*Vitis vinifera*) モデルでは、可溶性炭水化物はその種別により耐凍性への影響が異なるとする先行研究を踏まえて構築した (Sakai and Yoshida, 1968)。先行研究では単糖は細胞内の浸透濃度を調整する一方 (Sakai, 1962; Sakai and Yoshida, 1968)、RFO は膜安定化や抗酸化作用により凍結ストレスを軽減することが報告されている (Hinch et al., 2003; Nishizawa et al., 2008)。そこで VIT モデルでは、可溶性炭水化物を分子の大きさから 3 グループに分類し、各グループが耐凍性に対してそれぞれの寄与率を持つことを仮定したモデルである。すなわち、説明変数として、単糖（フルクトースおよびグルコース）の合計値、二糖（スクロース）および RFO（ラフィノースおよびスタキオース）の合計値を設定した。VIT モデルは次式で表される。

$$LTE = \alpha \times \frac{\ln(\sum(\pi_i \times SCG_i))}{WC} + I$$

ここで SCG_i は各可溶性炭水化物グループの含量を、 π_i は各可溶性炭水化物グループの LTE への寄与率を示し、非線形最小二乗法によって算出した。

4 つ目の ISC (Individual Soluble Carbohydrate) モデルは、個々の可溶性炭水化物に基づくモデルであり、VIT モデルよりも多くの説明変数を持つ。ISC モデルは次式で表される。

$$LTE = \alpha \times \frac{\ln(\sum(\pi_i \times SC_i))}{WC} + I$$

ここで SC_i は各可溶性炭水化物を、 π_i は各可溶性炭水化物の LTE への寄与率を示し、VIT モデルと同様に、寄与率とその有意性を求めた。なお、VIT および ISC モデルにおいて、寄与率の計算が収束しないことを防ぐために、寄与率の下限値を 1.0×10^{-5} に設定し、それを下回った場合は計算アルゴリズムを強制的に終了させた。

各モデルパラメータ (α 、 I および各可溶性炭水化物の寄与率 π_i) の統計的有意性は、推定値とその漸近標準誤差に基づく t 検定により評価し、有意水準は $P < 0.05$ とした。

3-2-3. モデル検証

各モデルについて、RMSE（学習内誤差）、Leave-One-Year-Out（LOYO）法による RMSEP（予測誤差； $RMSEP_{LOYO}$ ）、自由度調整済み回帰係数（Adj. R^2 ）および赤池情報量規準（AICc）の 4 つの指標を用いて検証を行った。

RMSE は学習データに対する適合度を示す指標であり、値が小さいほど適合度が高いことを示す。RMSE は以下の式により算出した。

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$$

ここで、 n はサンプル数、 y_i は実測値、 $\hat{y}_i$ はモデル予測値を示す。

RMSEP は未知データに対する予測精度を示し、値が小さいほど予測精度が高いことを示す。RMSEP は先行研究の手法に則り LOYO 法により算出した（Song et al., 2022）。すなわち、 k 番目の年を除いた $K-1$ 年分のデータを学習に用いて構築したモデルを、 k 番目の年のデータに適用した際の予測誤差を求める作業を全ての年について行い、データ数で加重平均して算出した。 $RMSEP_{LOYO}$ は以下の式により算出した。

$$RMSEP_{LOYO} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^{n_k} (\hat{y}_{k,i} - y_{k,i})^2}{N}}$$

ここで、 K はデータの対象となる年の総数、 n_k は k 番目の年に含まれるサンプル数、 N は全年を通したサンプルの総数、 $y_{k,i}$ は k 番目の年の i 番目のサンプルの実測値、 $\hat{y}_{k,i}$ は k 番目の年の i 番目のサンプルのモデル予測値を示す。

Adj. R^2 （自由度調整済み決定係数）は、データのばらつきのうちモデルが説明できる割合を示し、値が 1 に近いほど、モデル性能が高いことを示す。Adj. R^2 は以下の式により算出した。

$$Adj. R^2 = 1 - \frac{n \times (n - 1) \times RMSE^2}{(n - l) \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

ここで、 n はサンプル数を、 l は説明変数の数を、 y_i はサンプル実測値を、 $\bar{y}$ は全サンプルの平均値を示す。

AICc（赤池情報量規準）は、モデルの性能と複雑さのバランスを示す指標であり、値が小さいほど良好なモデルであることを示す。AICc は以下の式により算出した。

$$AICc = 2n[\log(RMSE) + \frac{l}{n-l-1}]$$

ここで、n はサンプル数を、l は説明変数の数を示す。

3-3. 結果

3-3-1. ‘ピノ・ノワール’の越冬芽における耐凍性、含水量および可溶性炭水化物含量の季節変動

‘ピノ・ノワール’の越冬芽の耐凍性は、3 シーズンともほぼ同じパターンの季節変動を示した。すなわち、低温馴化期の 10 月から厳冬期の 1 月または 2 月にかけて耐凍性が向上し、春の昇温にともなって、耐凍性が減衰した (Fig. 17)。¹ ‘ピノ・ノワール’の最大の耐凍性は 3 年とも -24°C 前後と年次間で同程度であった。

‘ピノ・ノワール’の越冬芽の含水量は、3 シーズンとも低温馴化期の 10 月から 12 月にかけて減少した (Fig. 18)。その後の季節変動には年次間差がみられ、1 年目は 12 月以降も 2 月にかけて減少し、その後 4 月にかけて増加傾向を示した。2 年目は 12 月以降、増減を繰り返す変動パターンを示した。3 年目は 12 月から 1 月にかけて僅かに増加し、その後 4 月にかけて減少傾向を示した。

‘ピノ・ノワール’の越冬芽の可溶性炭水化物含量は、GFS、TSC、グルコース、フルクトースおよび単糖の合計値のいずれにおいても、似たような季節変動を示した (Fig. 19–21, 24, 25)。すなわち 3 年を通じて、10 月または 11 月の低温馴化期から厳冬期の 1 月にかけて増加し、3 月以降の脱馴化期に減少した。ただし、2 年目は冬季に特徴的な変動を示し、1 月下旬から 2 月にかけて一時的に減少し、3 月にかけて再び増加した。

二糖であるスクロース含量は、年によって異なる変動を示した (Fig. 22)。1 年目は 10 月下旬以降 4 月にかけて一貫して増加した。2 年目では 12 月下旬から 1 月下旬にかけて増加した後、統計的な有意差は検出されなかったものの、増減を繰り返し、3 月下旬から 4 月中旬にかけて減少傾向を示した。3 年目は標準誤差が大きく、全期間を通じて有意な季節変動は検出されなかったものの、10 月から 11 月にかけて増加し、12 月にかけて一時減少した後 1 月に再び増加し、その後は 4 月までほぼ一定の含量で推移した。

RFO であるラフィノースおよびスタキオース、およびその合計値は、似た季節変動を示した (Fig. 23, 26, 27)。ただし、その変動パターンには年次差がみられた。1 年目では 10 月から 12 月にかけて増加し、その後は 4 月にかけて減少した。2 年目では 12 月下旬または 1 月上旬から 1 月下旬にかけて急増した後、2 月下旬にかけて減少傾向を示し、さらに 3 月下旬から 4 月上旬にかけても減少傾向を示した。3 年目は標準誤差が大きく、全期間を通じて有意な季節変動は検出されなかったものの、2 月で最大値を示した後、4 月にかけて減少傾向を示した。

3-3-2. 耐凍性と、含水量および各可溶性炭水化物含量との関連

含水量は耐凍性と正の相関を、各可溶性炭水化物含量は耐凍性と負の相関を示した (Table 16)。すなわち、含水量が低いほど、可溶性炭水化物含量が高いほど耐凍性は高い傾向にあることを示す。可溶性炭水化物の中では、グルコースおよび TSC が最も強い相関を示した。一方、スタキオースは $r = -0.330$ と他の可溶性炭水化物と比較して最も弱い相関を示した。

3-3-3. 可溶性炭水化物含量および含水量に基づく耐凍性モデルの構築および検証

本節では、先行研究の手法に基づき説明変数の構成によって 4 つのモデルを構築した。また、LOYO 法によってモデルの性能を検証した。LOYO による検証では、4 つ全てのモデルにおいて、2022/23 年および 2024/25 年を学習データとして用いた場合に、RMSE が最小で Adj. R^2 が最大であった (Fig. 28–31)。一方、4 つ全てのモデルにおいて、2 月に一時的な可溶性炭水化物含量の減少がみられた 2023/24 年および可溶性炭水化物含量の標準誤差が大きい 2024/25 年を学習データとして用いたモデルは、他の年のデータを基に構築したモデルと比較して Adj. R^2 が最低であった。

LOYO 法によって選択された最終的なモデルを Fig. 32 および Table 17 に示した。4 つのモデルのうち、ISC モデルが最も良好な推定効率を示し、データ分散をモデルが説明する割合である Adj. R^2 は 0.756 と 4 つのモデルの中で最も値が高かった。未知データに対する予測精度を示す $RMSEP_{LOYO}$ についても ISC モデルが最小の 2.97°C を示した (Table 17)。一方で、 $RMSEP_{LOYO}$ は VIT モデルで最大の 3.52°C であった。ISC および VIT モデルでは、各可溶性炭水化物グループまたは各可溶性炭水化物の寄与度が推定されたものの、標準誤差が大きく、いずれも有意性は認められなかった。さらに、ISC モデルでは、フルクトース、スクロースおよびスタキオースの寄与度が、寄与率の下限值として設定した 1.0×10^{-5} を下回り、その結果計算アルゴリズムが強制終了された。

3-4. 考察

3-4-1. ‘ピノ・ノワール’の越冬芽における耐凍性と含水量および可溶性炭水化物含量との関連

‘ピノ・ノワール’の越冬芽における季節変動をみると、含水量の顕著な変化は、総可溶性炭水化物含量の変動よりも早い時期に開始した。(Fig. 18–21, 24, 25)。多くの木本植物においても、含水量の減少開始時期が可溶性炭水化物含量の増加開始時期よりも早いことが報告されており、本研究結果はそれと一致した (Baffoin et al., 2021)。

また、2年目の‘ピノ・ノワール’の越冬芽における各可溶性糖類の含量は、1月から2月上旬にかけて減少し、その後2月中旬まで同程度で推移し3月に再び増加した (Fig. 19–21, 24, 25)。2月の中旬には圃場の日最高気温が10°Cを超える日が複数観測されたものの、可溶性糖類の含量の減少開始時期とは一致しなかった (Fig. 2)。すなわち、本研究において糖動態は気温変動と単純に対応しないことが示唆された。ブドウ越冬芽における可溶性糖類の季節変動については、気温変動と連動するという報告 (Grant and Dami, 2015) だけでなく、必ずしも一致しない事例も報告されている (De Rosa et al., 2022)。De Rosa et al. (2022) は、可溶性糖類には浸透圧調節機能のみならず、シグナル分子としての機能を有する可能性を指摘したうえで、その変動が単純に気温変化のみに依拠しない可能性を指摘している。本研究の結果もこの見解と整合しており、越冬芽における糖動態は休眠状態の変化や内部代謝制御と関連している可能性が考えられる。ただし、ブドウ越冬芽における糖のシグナル分子としての機能や代謝制御機構については未解明な点が多く、本研究結果の解釈には限界があるため、今後は分子生理学的解析を含む詳細な検討が必要である。

‘ピノ・ノワール’の越冬芽のLTEは、含水量と正の相関を、各可溶性炭水化物含量と負の相関を示し (Table 16)、越冬芽の含水量が少なく可溶性炭水化物含量が多いほど耐凍性が高い傾向にあることを示し、先行研究の報告と一致した (Jones et al., 1999; Ershadi et al., 2016)。またスタキオースは、他の可溶性炭水化物と比較して弱い相関を示した (Table 16)。ブドウ越冬芽では、品種によるものの、耐凍性とスタキオースの関連が他の可溶性炭水化物と比較して弱いことが報告されており、本研究結果も同様であった (Grant and Dami, 2015)。

3-4-2. 耐凍性推定モデル4種類の比較検討

本研究で構築した4つのモデルについて比較すると、JUGモデルの説明変数であるGFSに、RFOを加えたTOTモデルは、JUGモデルよりも僅かに性能が向上していた (Table 17)。これは、ブドウ越冬芽の耐凍性には可溶性糖類に加えてRFOも寄与する (Grant and Dami, 2015; Jones et al., 1999) ためだと考えられた。

可溶性炭水化物含量はその種別によって植物組織の耐凍性への寄与が異なることが報告されている (Sakai and Yoshida, 1968)。例えば単糖は細胞内の浸透濃度を調整に寄与するのに対し (Sakai, 1962)、RFOは膜安定化作用や抗酸化作用を介して凍結ストレスを低減することが報告されている (Hinch et al., 2003; Nishizawa et al., 2008)。Baffoin et al. (2021) は、こうした可溶性炭水化物の機能的多様性を考慮するため、各可溶性炭水化物が独立して耐凍性と相関すると仮定したISCモデルを構築した。このモデルは説明変数の情報量が多く、目的変数である耐凍性の大部分を説明できるのに対し、構築の際の計算量が大きいことが難点であると指摘されている。そこで本節では、可溶性炭水化物の分子サイズに着目し、単糖、二糖、RFOの3つのグループに分けたVITモデルを構築した。VITモデルはTOTモデルと比較してAdj. R^2 が僅かに向上したものの、RMSEP_{LOYO}は約0.4°C悪化し、その結果AICcも増加した (Table 17)。この理由としては、同じグループに属する可溶性炭水化物であっても耐凍性との関連の強さが異なったため (Table 16) だと考えられる。

ISCモデルは4つのモデルのうち最も高い精度を示し、RMSE、Adj. R^2 、およびAICcのいずれの指標においても最良の性能を示した。ISCモデルがJUGおよびTOTモデルと比較して精度が高いことは、11種類の本本植物を用いた先行研究の結果と一致した (Baffoin et al., 2021)。ISCモデルにおいて、グルコースおよびラフィノースは、統計的な有意性こそ検出されなかったものの、耐凍性への寄与係数が比較的大きく算出された。その一方、それぞれ同じ可溶性炭水化物グループに属するフルクトースおよびスタキオースは係数が非常に小さかった。この係数の大小は、先行研究の11種類の本本植物を対象としたISCモデルでも同様であった (Baffoin et al., 2021)。本節で示した相関分析の結果、単糖間ではグルコースはフルクトースより、RFOではラフィノースがスタキオースよりもLTEとの相関が高かった (Table 16)。これらの結果は、同じ可溶性炭水化物グループに分類される化合物であっても、‘ピノ・ノワール’越冬芽の耐凍性に及ぼす影響が一樣ではないことを示唆している。したがって、このような物質ごとの耐凍性への寄与の差異が要因となり、各化合物を同一グループとして扱うVITモデルよりも、詳細な変数構成をもつISCモデルの方が精度が高くなったものと考えられる。

ISCモデルは4つのモデルのうち、最良の精度を示したが、全体のデータ分散の約24%は説明されず、耐凍性の変動を完全には捉えきれなかった (Table 17)。このことについて、

Baffoin et al. (2021) は、可溶性炭水化物含量および含水量以外の耐凍性に影響する因子、例えばプロリンや他のアミノ酸などについて言及している (Smith, 1968; Withers and King, 1979)。ブドウ越冬芽の耐凍性においても、含水量および可溶性炭水化物含量に加えて、アミノ酸やポリフェノールをはじめとする各種化合物の含量、ならびに細胞壁および細胞膜の構造変化など、多様な要因が関与することが報告されており (Karimi, 2017; Jones et al., 2000; Kasuga et al., 2020)、第 1 章 3 節においてもいくつかの組織内成分において、耐凍性との関連がみられた (Table 14)。したがって、これらの生理学的小および形態学的要因が ISC モデルで説明できなかった分散に寄与している可能性が高い。今後はこれらの指標を組み込んだ、さらに統合的なモデルの構築が必要であると考えられる。

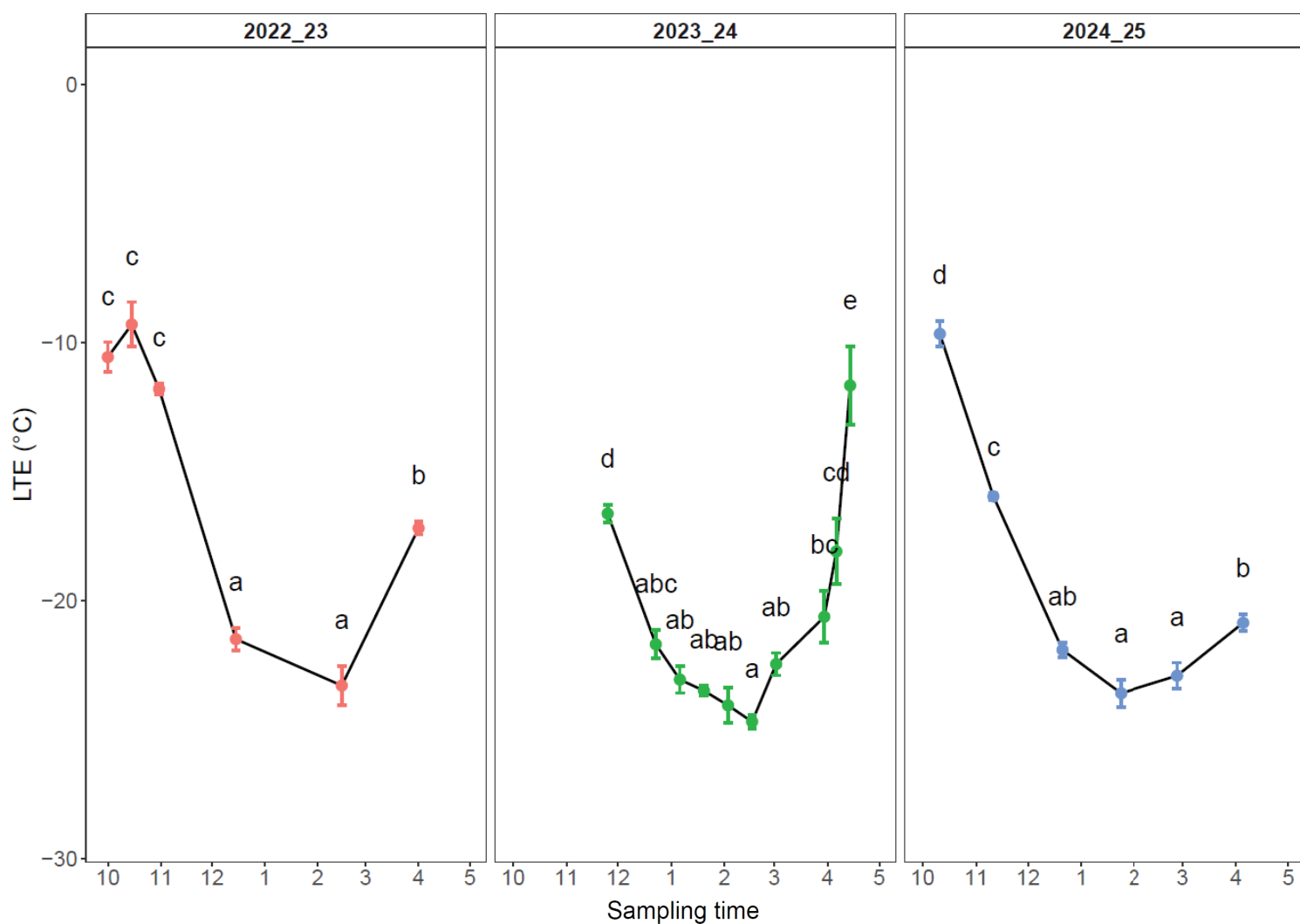


Fig. 17. Seasonal changes in freezing resistance of 'Pinot Noir' buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer's test.

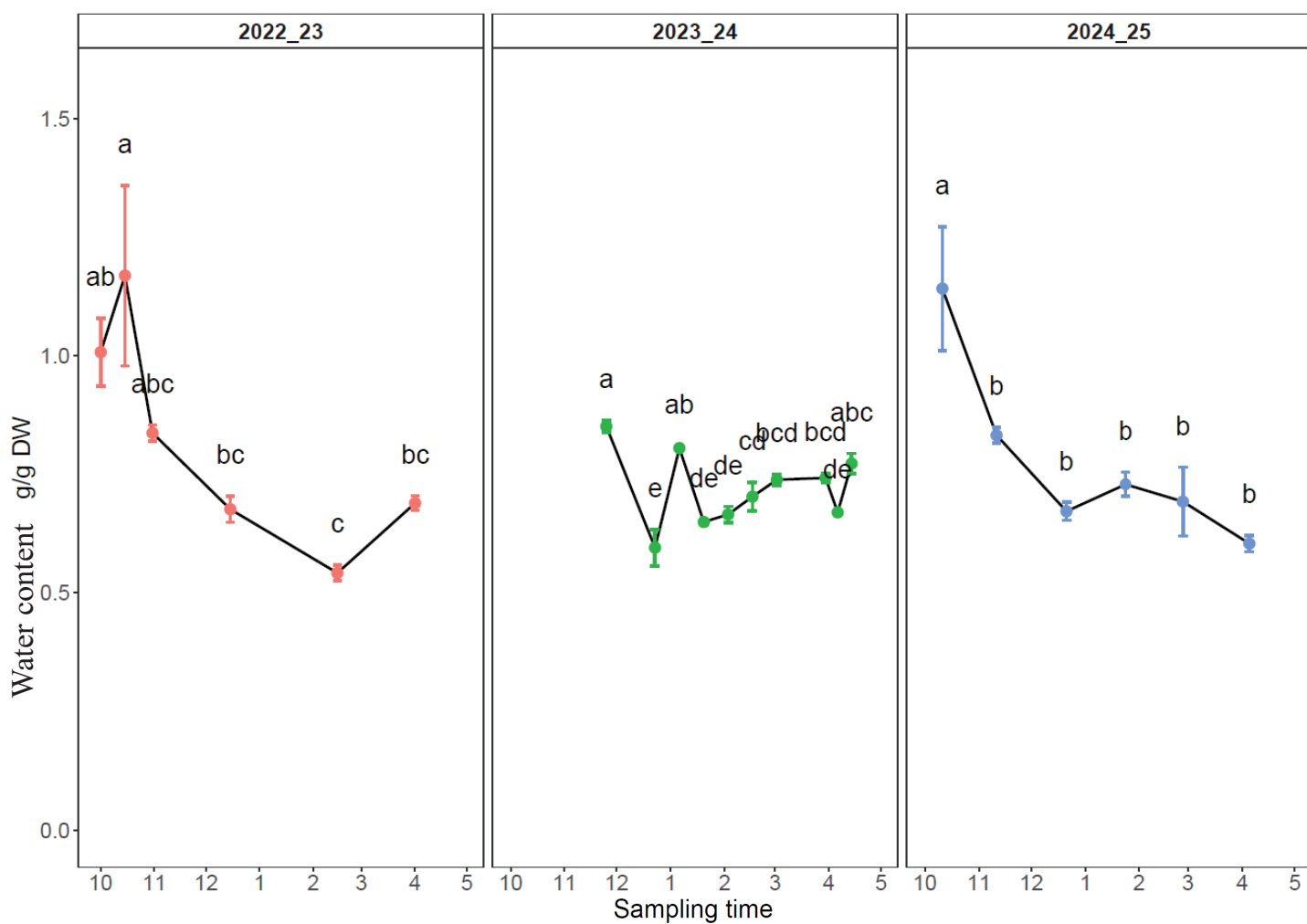


Fig. 18. Seasonal changes in water content of ‘Pinot Noir ’ buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer’s test.

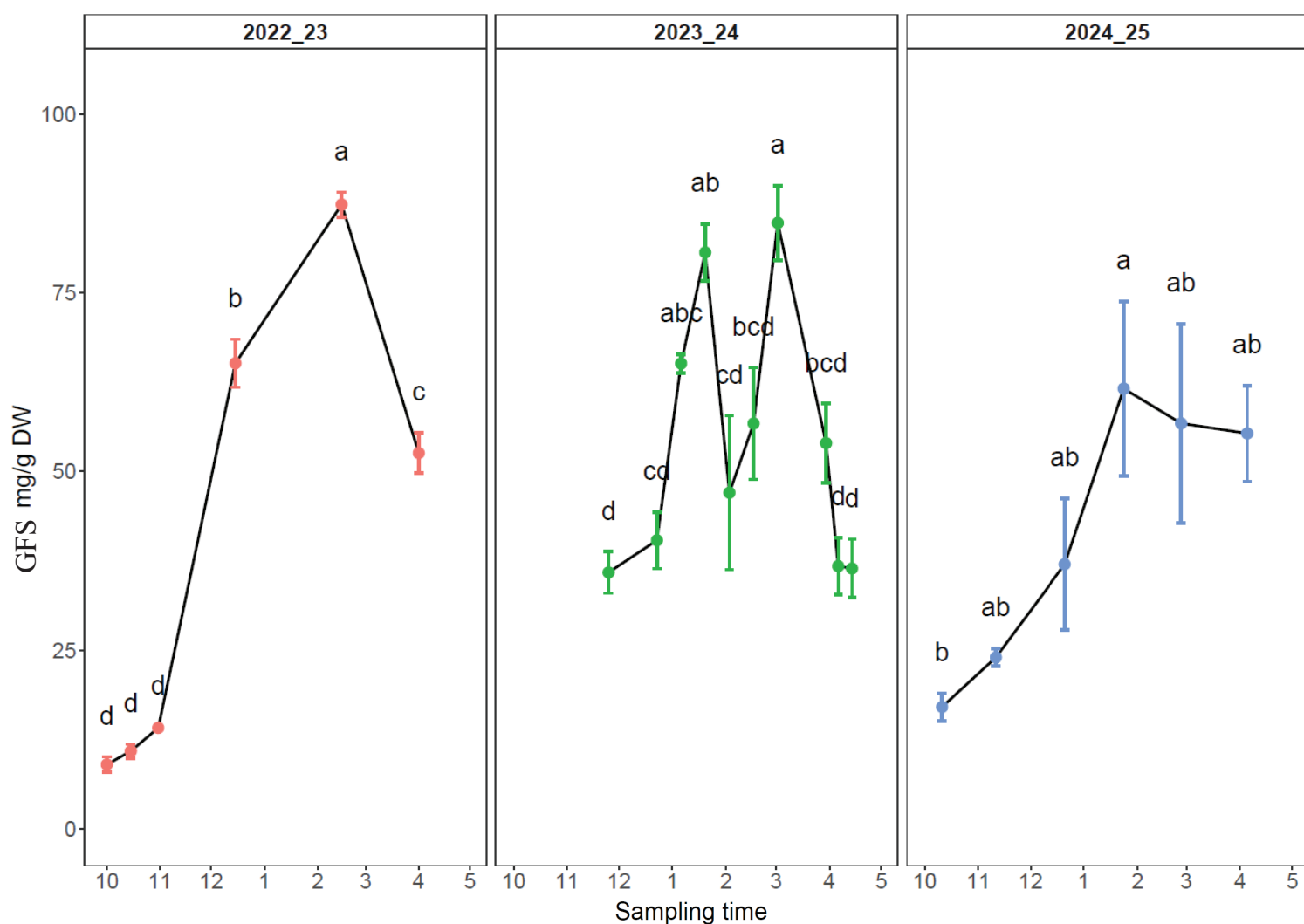


Fig. 19. Seasonal changes in GFS content of ‘Pinot Noir ’ buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer’s test.

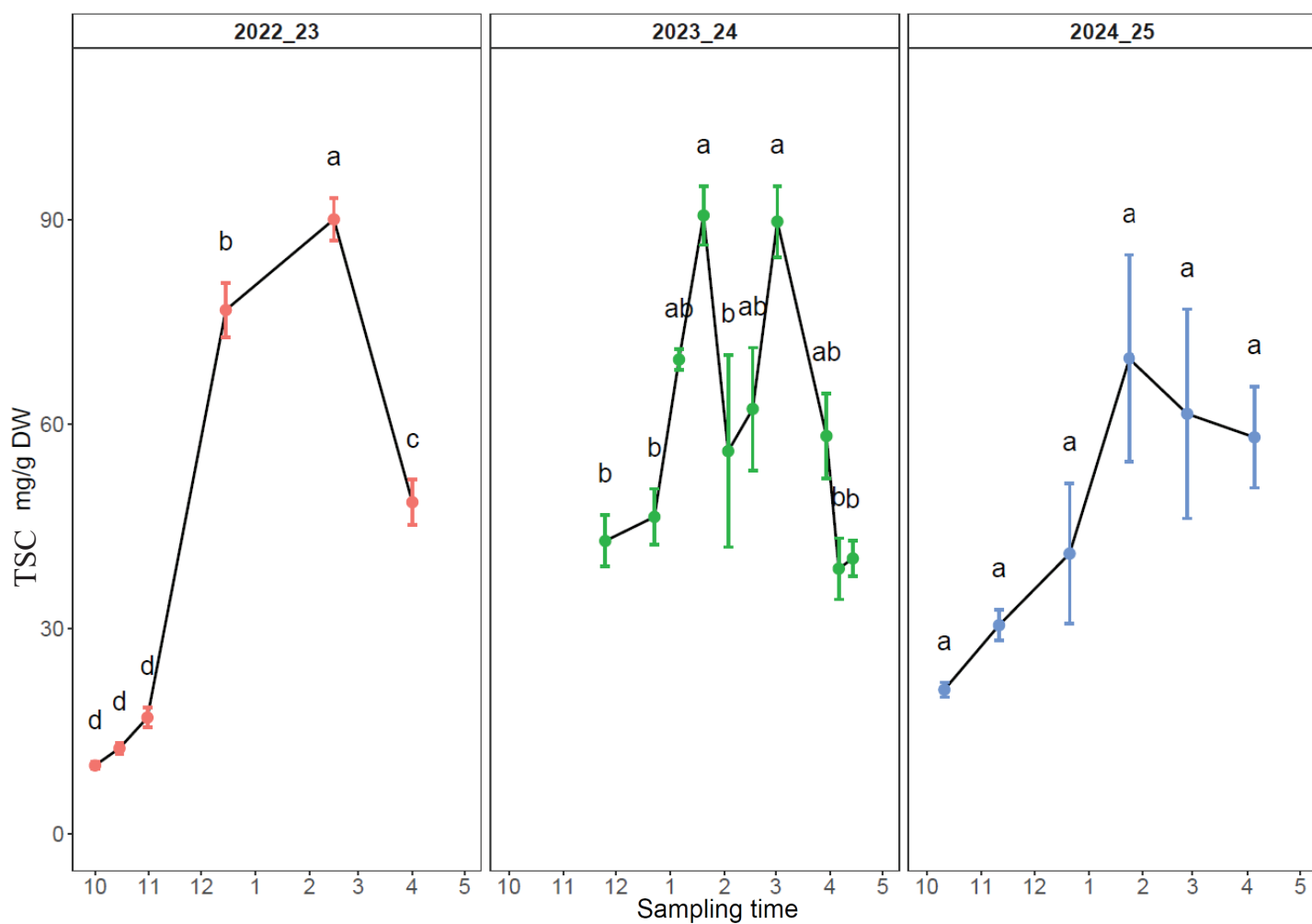


Fig. 20. Seasonal changes in TSC content of 'Pinot Noir' buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer's test.

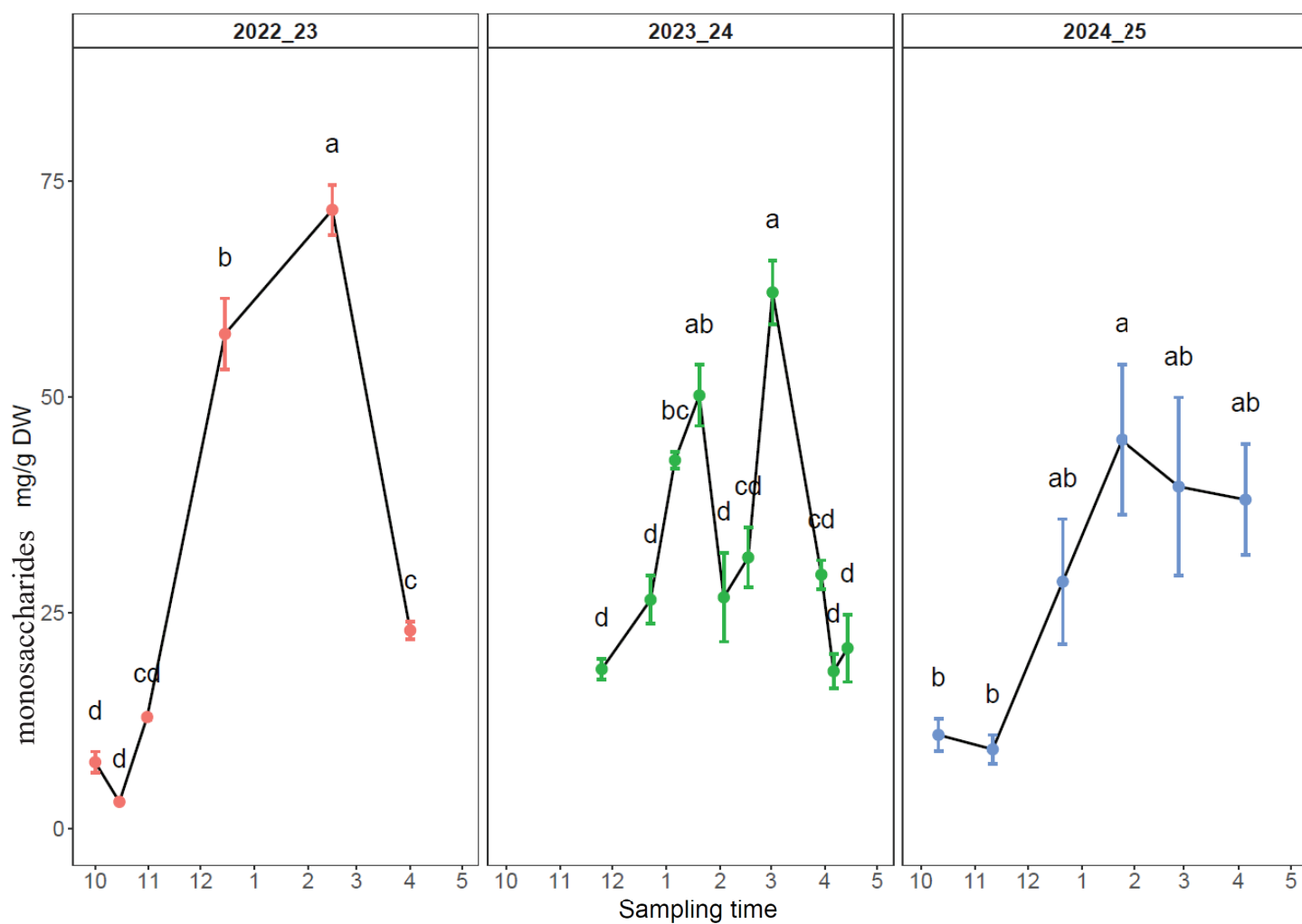


Fig. 21. Seasonal changes in monosaccharides content of 'Pinot Noir' buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer's test.

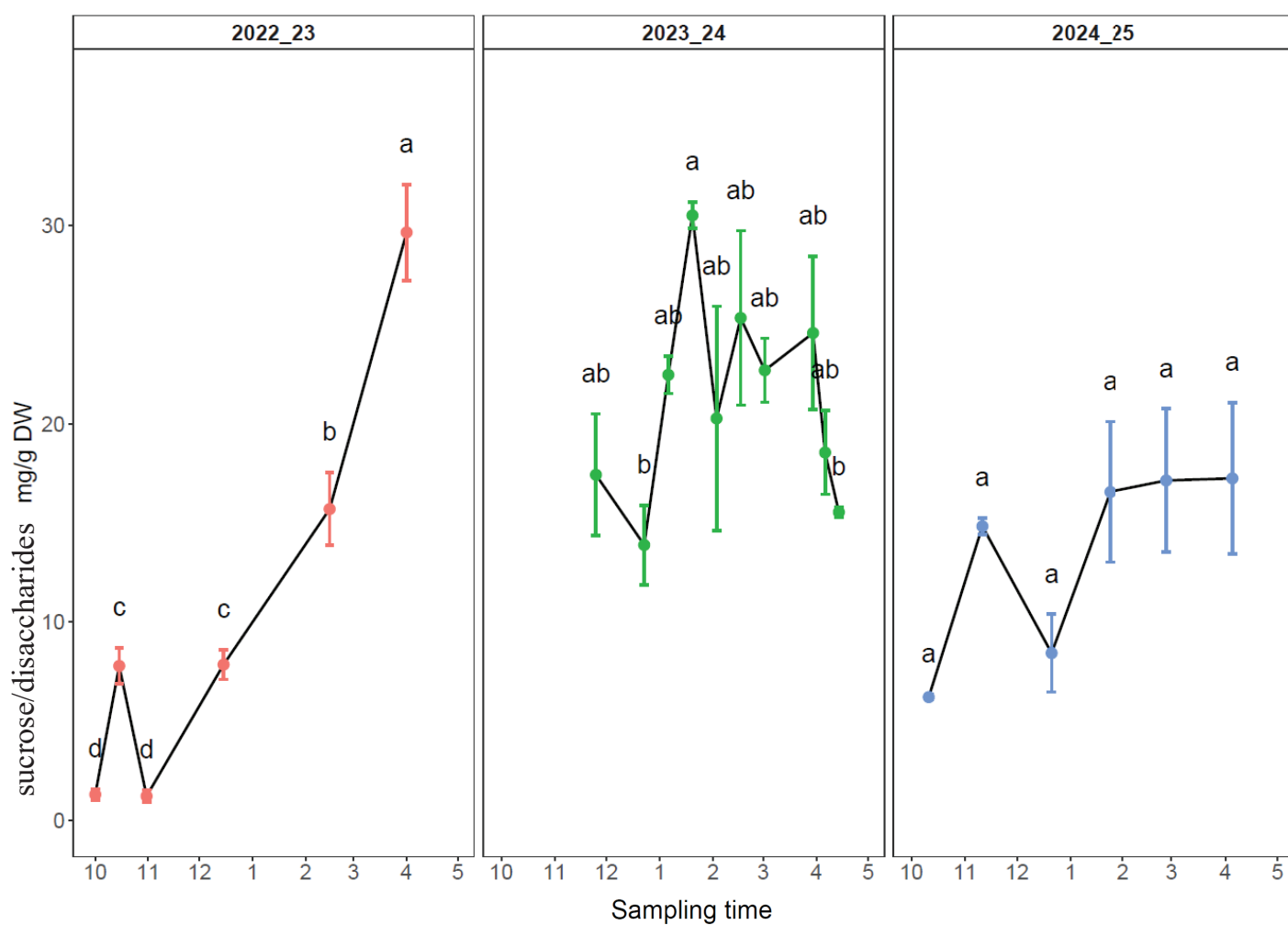


Fig. 22. Seasonal changes in sucrose/disaccharide content of 'Pinot Noir' buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer's test.

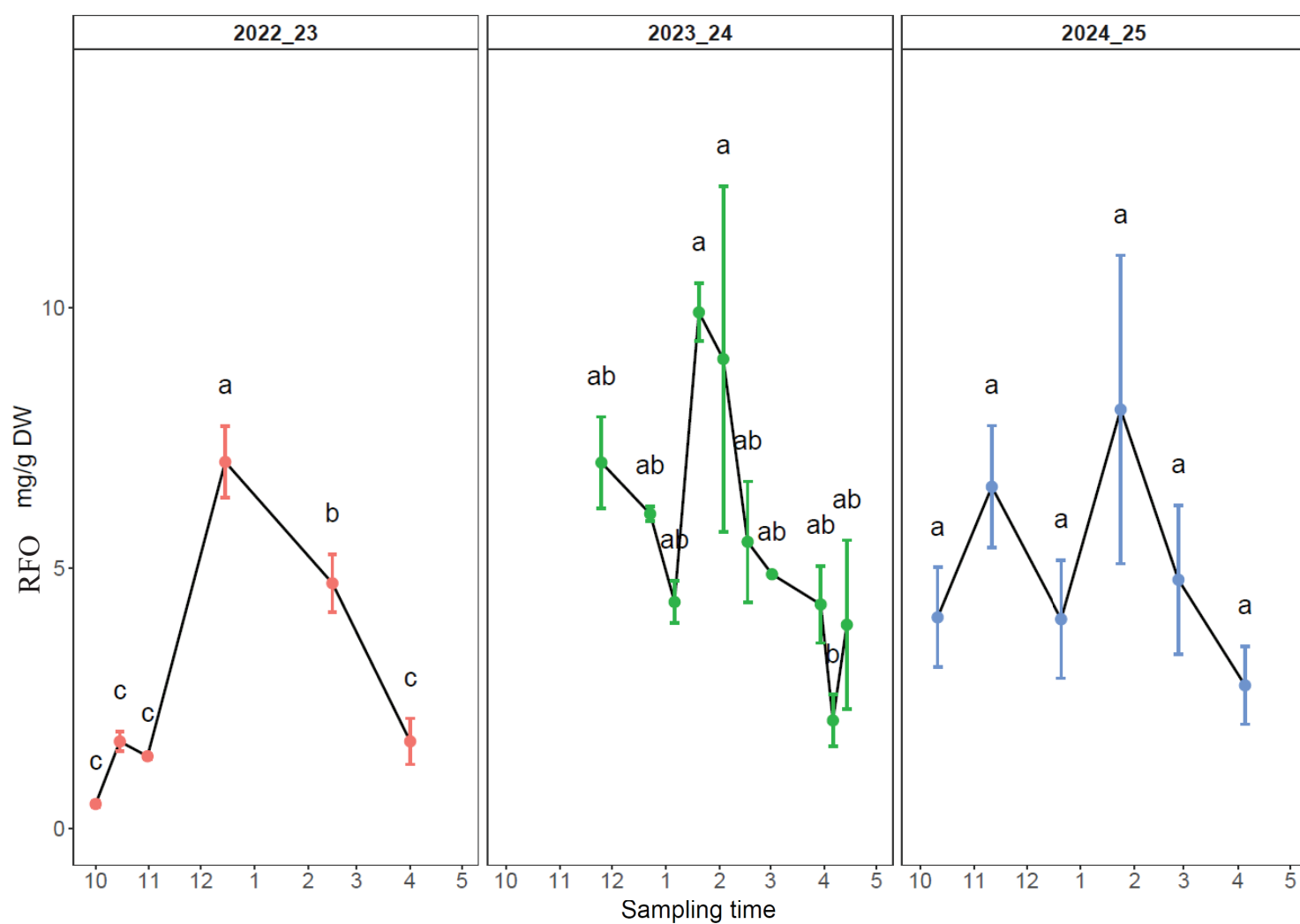


Fig. 23. Seasonal changes in RFO content of 'Pinot Noir' buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey-Kramer's test.

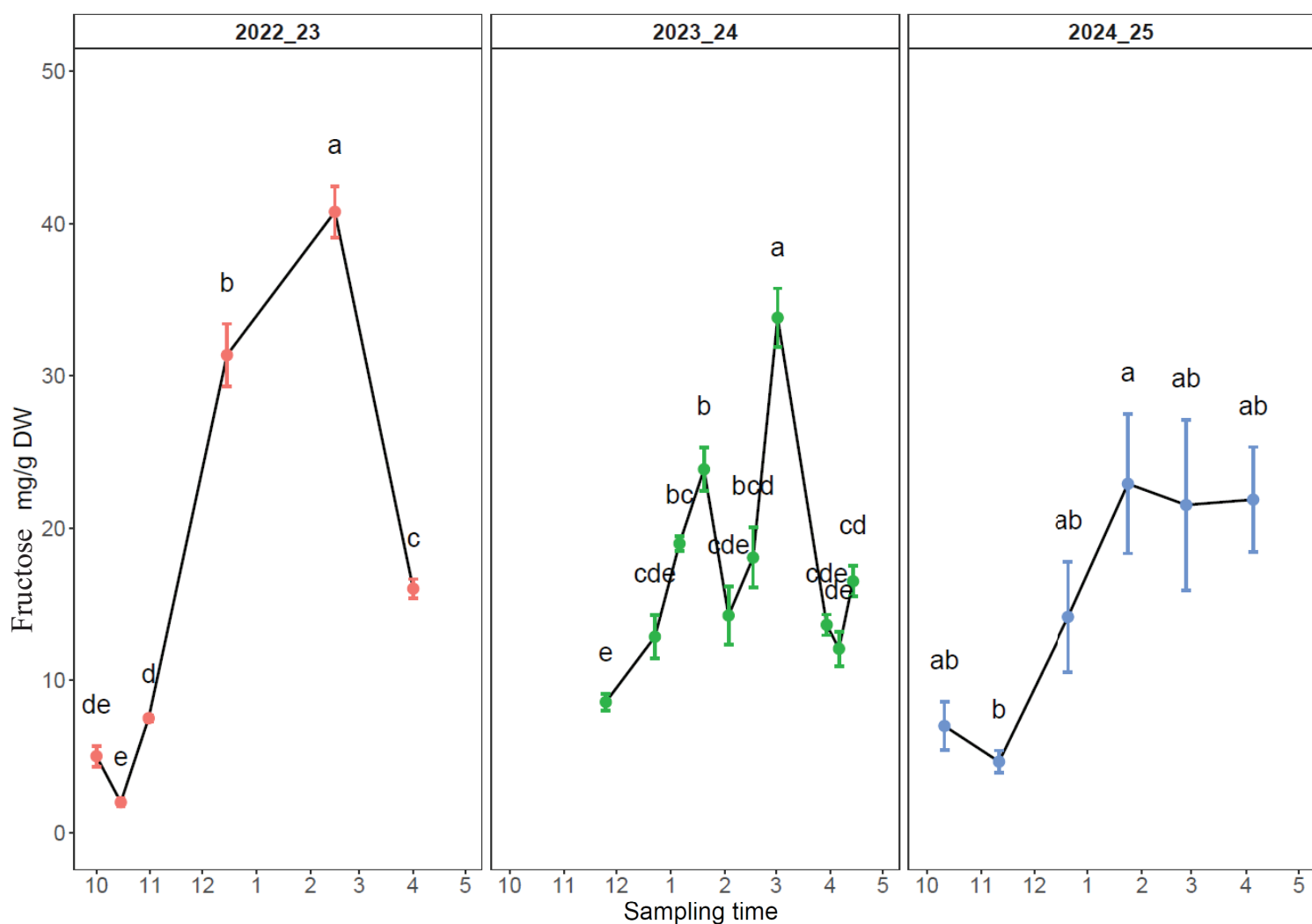


Fig. 24. Seasonal changes in fructose content of 'Pinot Noir' buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey-Kramer's test.

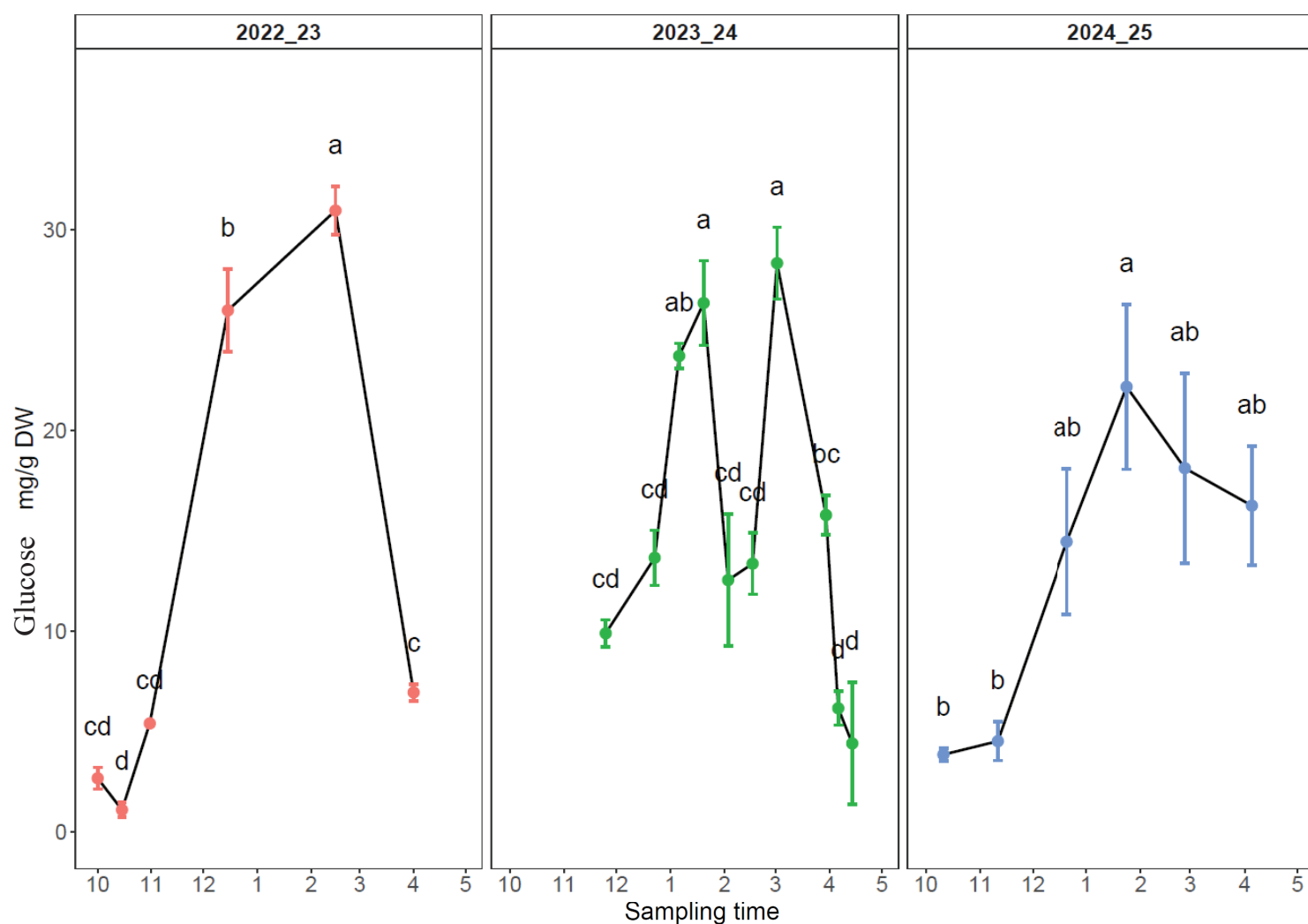


Fig. 25. Seasonal changes in glucose content of ‘Pinot Noir’ buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer’s test.

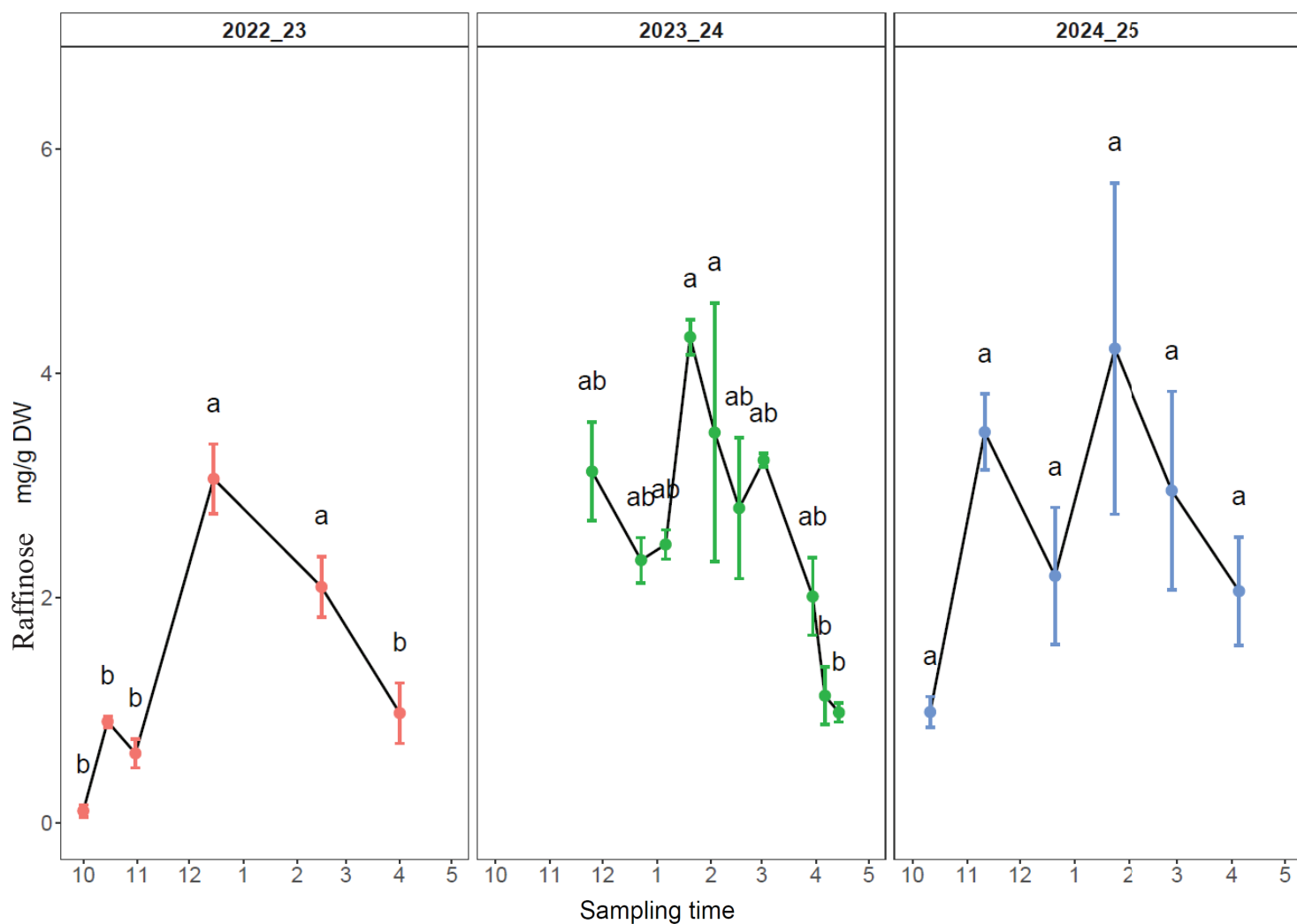


Fig. 26. Seasonal changes in raffinose content of 'Pinot Noir' buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer's test.

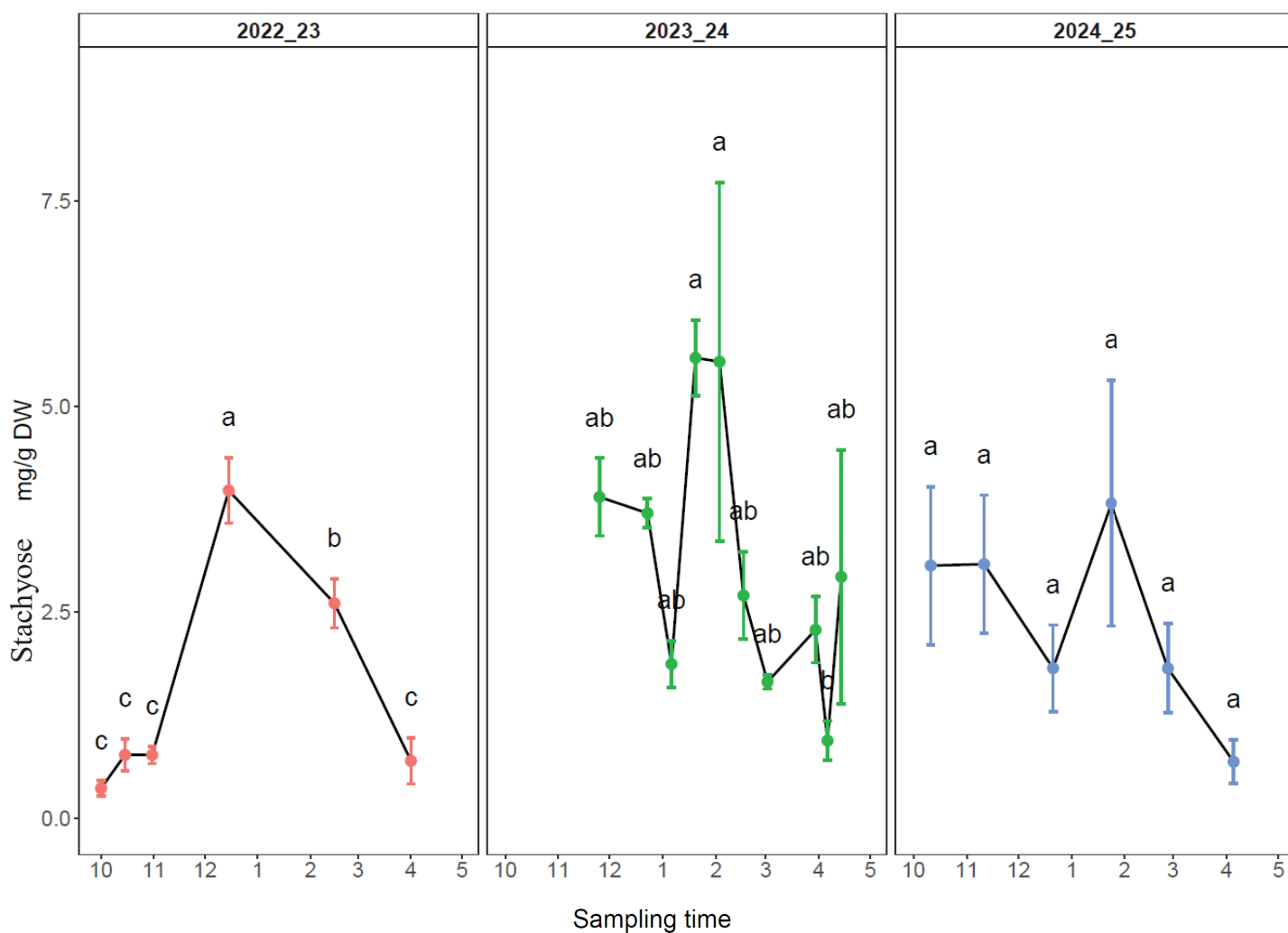


Fig. 27. Seasonal changes in stachyose content of ‘Pinot Noir ’ buds.

Data represents mean value $\pm$ S.E. (n = 3).

Different letters indicate significant difference at 5% level among sampling time at the same year in Tukey–Kramer’s test.

Table 16. Pearson correlation coefficients between LTE and other factors.

	<i>r</i>	Sig.
WC	0.730 ***	
Fructose	−0.635 ***	
Glucose	−0.749 ***	
Sucrose	−0.542 ***	
Raffinose	−0.622 ***	
Stachyose	−0.330 **	
TSC	−0.765 ***	

*** and ** represent significant at 0.1%, 1% levels of Pearson's correlation analysis respectively (n = 66).

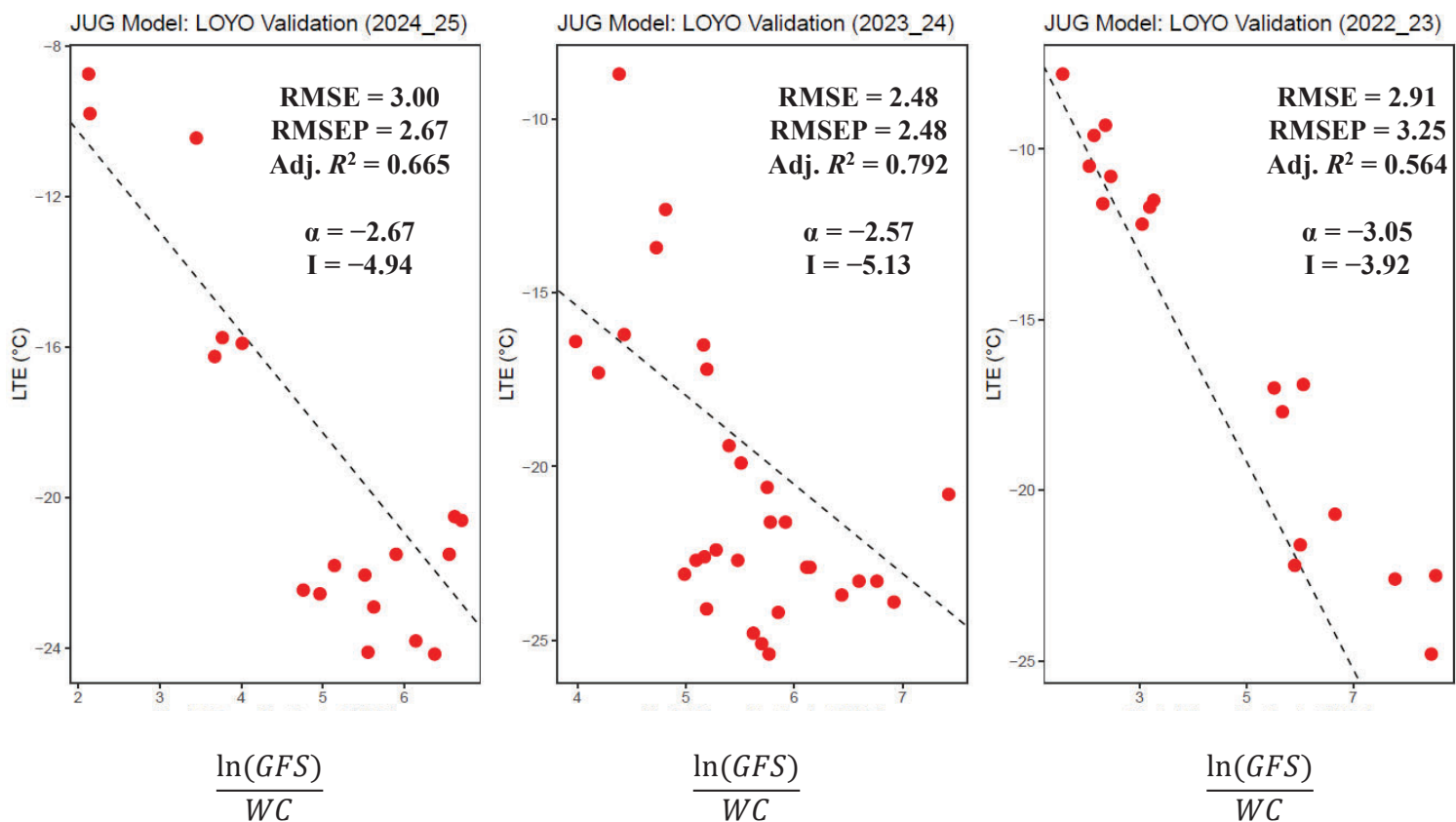


Fig. 28. The construction and validation of the JUG model using the leave-one-year-out (LOYO) method.

For each year from 2022/23 to 2024/25, the model was trained using 2-years' data to predict the excluded year.

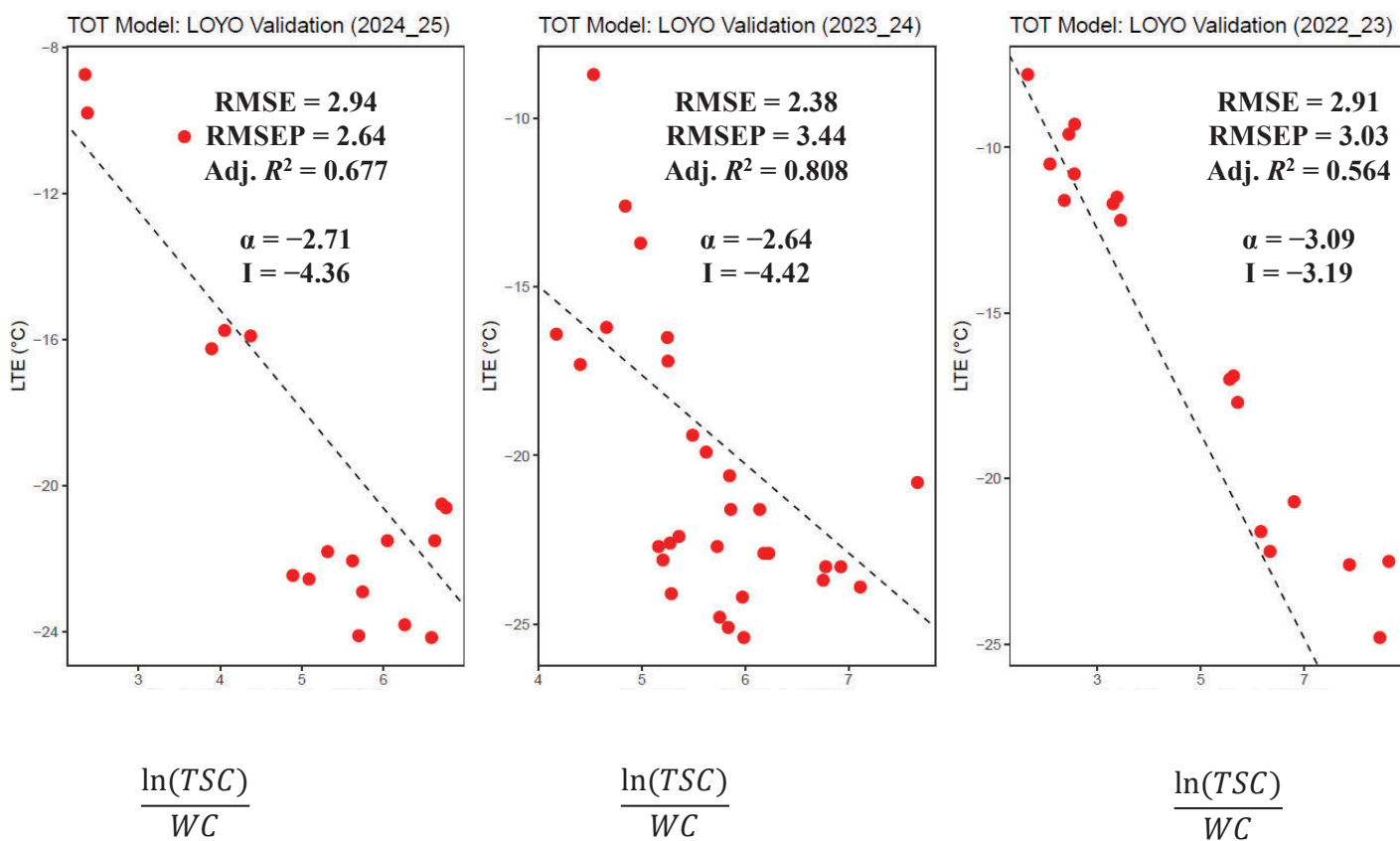


Fig. 29. The construction and validation of the TOT model using the leave-one-year-out (LOYO) method.

For each year from 2022/23 to 2024/25, the model was trained using 2-years' data to predict the excluded year.

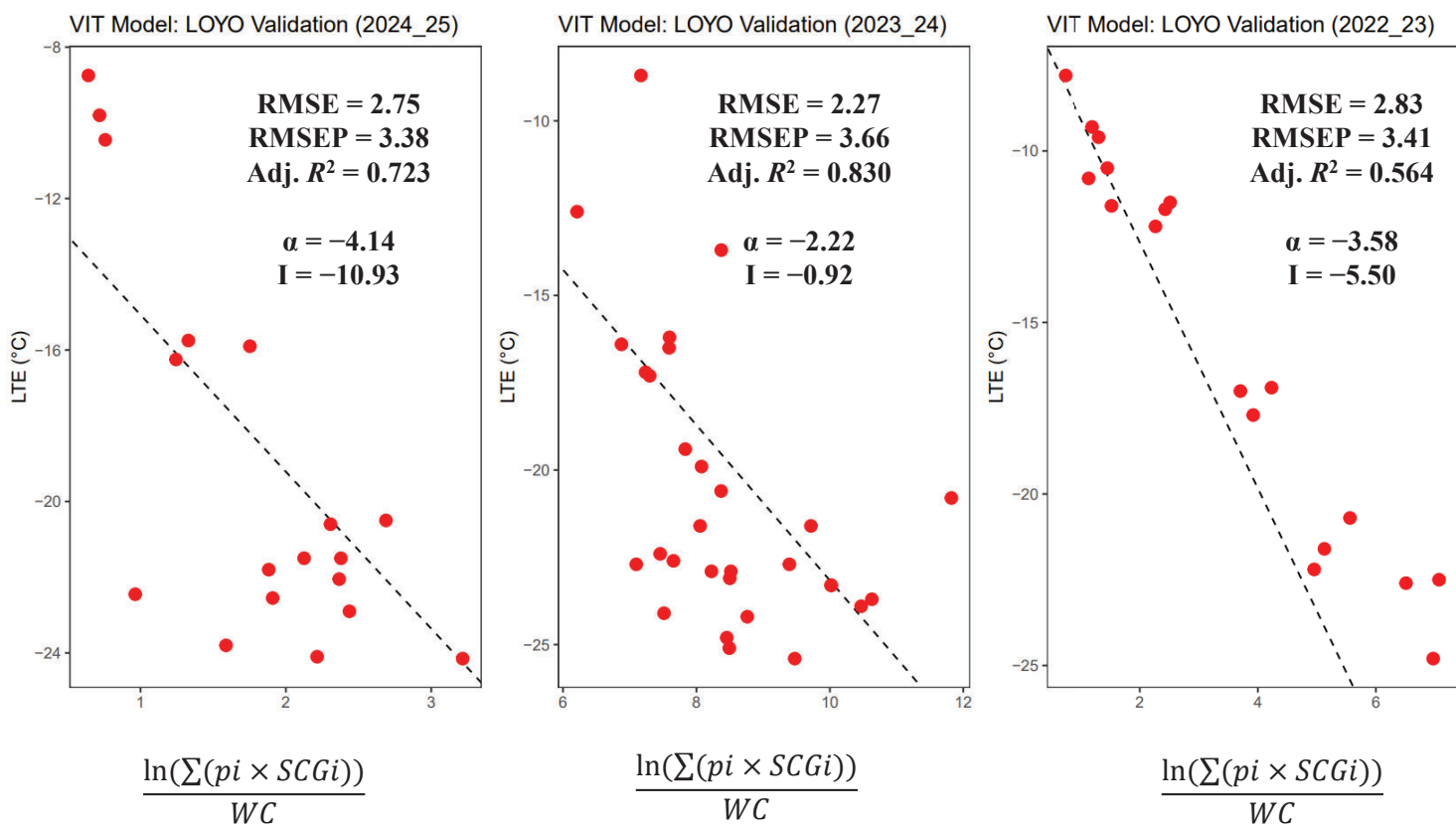


Fig. 30. The construction and validation of the VIT model using the leave-one-year-out (LOYO) method.

For each year from 2022/23 to 2024/25, the model was trained using 2-years' data to predict the excluded year.

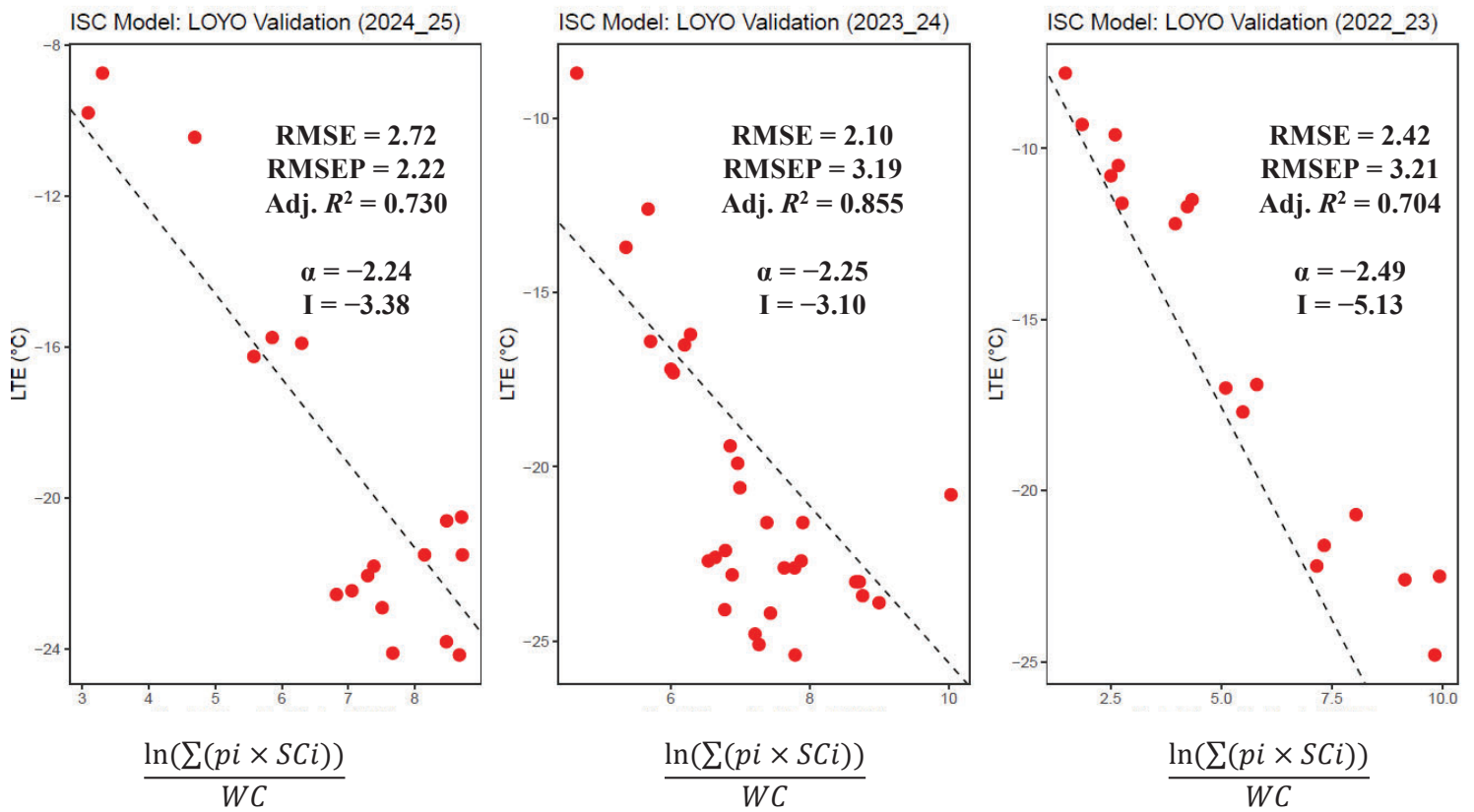


Fig. 31. The construction and validation of the ISC model using the leave-one-year-out (LOYO) method.

For each year from 2022/23 to 2024/25, the model was trained using 2-years' data to predict the excluded year.

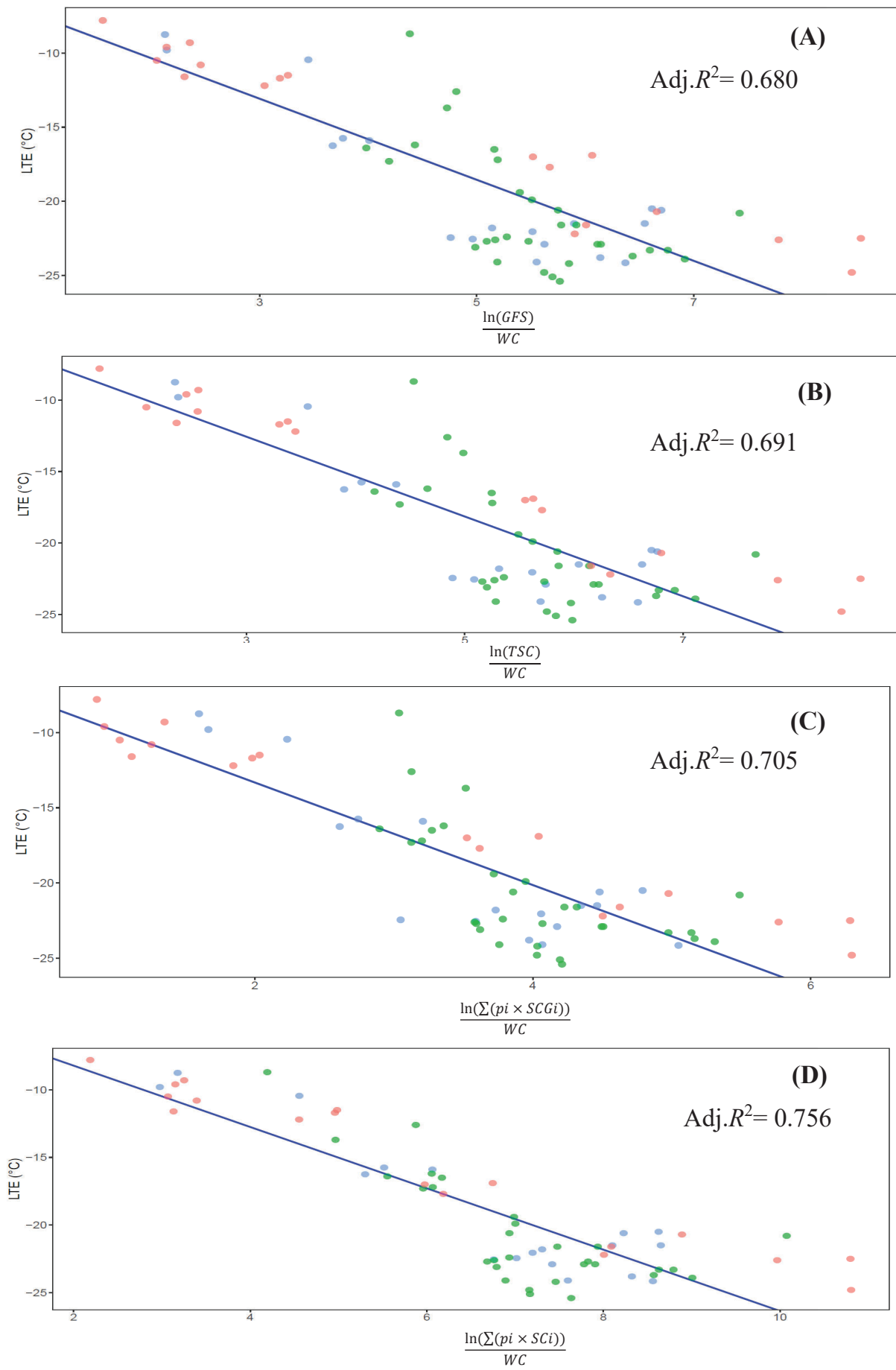


Fig. 32. Relationship between freezing resistance (LTE) and each model term using water content and soluble carbohydrate content.
 (A) JUG; sum of GFS, (B) TOT; TSC, (C) VIT; by a parameter pi fitted by SCGi, (D) ISC; ; by a parameter pi fitted by SCi.

Table 17. Comparison of the four different models for estimating freezing resistance of buds using the content of soluble carbohydrates and water.

Model	Df	RMSE	RMSEP _{LOYO}	Adj. <i>R</i> ²	AICc	Parameter	Estimate	SE	Sig
(1) JUG $LTE = \alpha \times \frac{\ln(GFS)}{WC} + I$	64	2.90	3.21	0.680	334.0	α	-2.73	± 0.23	***
						I	-4.88	± 1.24	***
(2) TOT $LTE = \alpha \times \frac{\ln(TSC)}{WC} + I$	64	2.84	3.13	0.691	331.7	α	-2.79	± 0.23	***
						I	-4.19	± 1.26	**
(3) VIT $LTE = \alpha \times \frac{\ln(\sum(pi \times SCGi))}{WC} + I$	61	2.94	3.52	0.705	336.7	α	-3.41	± 0.56	***
						I	-6.51	± 2.47	*
						p_Mono	0.29	± 0.24	ns
						p_Di	0.17	± 0.18	ns
						p_RFO	0.87	± 1.00	ns
(4) ISC $LTE = \alpha \times \frac{\ln(\sum(pi \times SCi))}{WC} + I$	59	2.55	2.97	0.756	329.3	α	-2.27	± 0.51	***
						I	-3.69	± 2.30	ns
						p_Fru	<0.0001	± 2.85	ns
						p_Suc	<0.0001	± 1.76	ns
						p_Raf	20.79	± 41.56	ns
						p_Sta	<0.0001	± 8.87	ns
						p_Glu	8.19	± 14.63	ns

JUG (1) , TOT (2), VIT (3) and ISC model (4) calibrated on all data. SCGi, SCi and pi represent the soluble carbohydrate group content, the soluble carbohydrate content, and the parameter adjusted of the carbohydrate group and/or carbohydrate group i, respectively. Carbohydrates group i are presented monosaccharides (Mono), disaccharide (Di), and raffinose family oligosaccharides (RFO). Carbohydrates i are presented for fructose (Fru), glucose (Glu), sucrose (Suc), raffinose (Raf), stachyose (Sta) .

The degree of freedom (Df), the root mean squared error (RMSE), the root mean squared error of prediction calculated using the leave-one-year-out method (RMSEP_{LOYO}), adjusted *R*² (Adj.*R*²), corrected Akaike information criterion (AICc), slope (α) and intercept (I) with their respective estimate, standard errors (SE) and degree of significance (Sig.; *P*-value, ***<0.001, **<0.01, *<0.05, ns >0.05).

第4章 総合考察

北海道における醸造用ブドウ栽培は、気候変動の影響を受けて大きな転換期にある。1998年以降の気候シフトの後も（広田ら, 2016）、2050年まで北海道全域で温暖化傾向が継続し（Nemoto, et al., 2016; Hiraga and Matsumoto, 2025）、2100年にかけて醸造用ブドウの栽培適正度が道内全域で高まることが予測されている（Hiraga and Matsumoto, 2025）。その一方で、秋季の高温は低温馴化を遅らせるとともに（Sakamoto et al, 2017）、早春の昇温とその後の低温（false spring）は、ブドウの凍害リスクを高めるため注意する必要がある（Londo and Kovaleski, 2019）。そこで本研究では、まず第2章で北海道で栽培される醸造用ブドウ *Vitis vinifera* およびブドウ属交雑種における越冬芽および当年生枝の耐凍性獲得機構を組織内成分の観点から明らかにするとともに、得られた知見に基づいて第3章で耐凍性推定モデルの構築を試みた。

第2章を通じて一貫して示された主要な知見は、ブドウ越冬芽および当年生枝のいずれにおいても、含水率および可溶性炭水化物が耐凍性に極めて強く関連していたことである。供試した多くの品種において、低温馴化期にあたる秋季から冬季にかけて含水率は顕著に減少し、可溶性炭水化物含量は増加した。一方、脱馴化期である春季においてはこれらが逆の挙動を示した。これらの結果は、ブドウを対象とした先行研究の知見と整合するものであった（Ershadi et al., 2016; Grant and Dami, 2015; Grant et al., 2009; Jones et al., 1999; Karimi, 2020）。

植物組織における含水率の低下は、細胞内溶液の浸透濃度を高めるとともに、細胞外凍結に伴う細胞膜への機械的ストレスを軽減する（Steponkus, 1984; Thomashow, 1999）。したがって、低温馴化期における含水率の減少は、ブドウ越冬芽において物理化学的に重要な役割を果たしているものと考えられる。また、含水率の減少は、細胞に対して脱水あるいは乾燥ストレスをもたらすが（Steponkus, 1984）、植物はデヒドリンタンパク質を蓄積することでこれらのストレスに対する耐性を獲得していることが知られている（Kosová et al., 2007）。ブドウ越冬芽においても低温およびアブシジン酸（ABA）によってCBF/DREB1転写因子の発現が相乗的に増加し（Rubio et al., 2019a）、低温馴化期において23–90 kDaのデヒドリンタンパク質が急増し、その発現量と耐凍性との間に強い関連があることが報告されている（Hébert-Haché et al., 2023, 2025）。また、ブドウの主要なデヒドリン遺伝子である *DHN1* および *DHN2* は、低温処理6時間後以降に増加することが報告されている（Yang et al., 2012）。ブドウ越冬芽においてデヒドリン発現量と含水率の変動の両方を測定した例は報告されておらず、詳細な因果関係については明らかではないものの、他の木本植物における知見を踏まえると（Karlson et al., 2003; Welling et al., 2004）、低温馴化の初期にデヒドリン等の保護タ

ンパク質の蓄積が先行あるいは同調して起こることで細胞の脱水耐性が強化され、その結果としてブドウ越冬芽における著しい含水率の低下をもたらしたものと考えられる。

可溶性炭水化物含量の増加は、植物の耐凍性向上に重要な役割を果たす。本研究において特筆すべき点は、品種や部位によって RFO 含量と耐凍性との相関の強さに差異が認められたことである。このように、品種によって耐凍性との関連の強い可溶性炭水化物の種類が異なることは、先行研究においても報告されている (Grant and Dami, 2015)。Grant and Dami (2015) は、耐凍性の高い品種は低温馴化期においてラフィノースの蓄積が、耐凍性の低い品種と比較して早い時期から始まることを報告しており、ブドウ越冬芽におけるラフィノースの重要性を強調している。このことと本研究の結果は、ブドウが耐凍性を獲得および維持するために動員する代謝経路やその寄与度には、遺伝的背景によって異なる品種間差が存在することを示唆している。すなわち、すべての品種が一様に RFO の蓄積のみに依存しているわけではなく、品種によっては単糖類の蓄積や特定のタンパク質の関与など、異なる戦略を複合的に組み合わせることで低温環境への適応を図っている可能性が考えられる。

こうした低温馴化中のブドウ越冬芽および当年生枝における可溶性炭水化物の蓄積には、複数の遺伝子が重要な役割を果たす。具体的には、*VvSUTs* および *VvHTs* などの糖トランスポーター遺伝子、*VvRafS5*、*VvGolS* および *VvSSs* などの糖質合成酵素遺伝子、 α -アミラーゼおよび *VvINV* などの糖質分解酵素遺伝子が挙げられる (Cai et al., 2019; Koussa et al., 2005; Noronha et al., 2022; De Rosa et al., 2022; Rubio et al., 2019b)。これらの遺伝子の発現は、ABA を中心とする植物ホルモンによる制御を受けていることが報告されている (Noronha et al., 2022; Ren et al., 2023; De Rosa et al., 2022; Rubio et al., 2019b)。ブドウ越冬芽においては、秋季の ABA の増加に伴って *VvSS* の発現が増加する一方で、*VvINV* の発現が抑制され、シンク活性が高まることで可溶性炭水化物の蓄積が促進される (Rubio et al., 2019b)。その後、冬季に ABA 濃度が低下すると、 α -アミラーゼ活性および *VvINV* の発現が増加し、デンプン分解が進行して細胞内の浸透濃度が上昇すると考えられている (Koussa et al., 2005; Rubio et al., 2019b)。さらに、ABA は RFO の蓄積に関与する *VvRafS* や *VvGolS* の遺伝子発現を促進することが報告されており (Wang et al., 2020; Zhang and Dami, 2012)、ABA が耐凍性獲得における糖代謝制御の中心的な役割を果たしていることが示唆される。今後は、これらのホルモン応答および代謝関連遺伝子の発現プロファイルを品種間で比較解析することで、耐凍性の品種間差を生理学的、分子生物学的レベルでより詳細に解明できると期待される。

一方で、脱馴化期においては、可溶性炭水化物が減少し、含水率は増加傾向を示した。この傾向は欧州種 (*V. vinifera*) と比較してブドウ属交配品種で顕著であった。一般に、*V. vinifera* よりも北米や大陸原産の *V. riparia* や *V. amurensis* などの遺伝的背景を持つ品種の方が脱馴

化が早く、早春の凍害リスクが高いことが指摘されている (Kovacs et al., 2003)。今後想定される春の不安定な気温推移は、これらの品種の凍害リスクを高める懸念があるため、2 段階剪定 (Poni et al., 2022) などの栽培方法の改変や、防霜ファンなどの凍害を防止するための物理的な対策 (Rahemi et al., 2022) も併せて重要となる。

また、一部の品種では、アルギニン、トリプトファンなどのアミノ酸、レスベラトロールなどのフェノール化合物が LT_{50} との負の相関、すなわち耐凍性が高いほど含量が多い関係性を示した。これらの成分は細胞内の浸透濃度の調整や窒素代謝、抗酸化作用などの多様な生理機能を持つことが知られる (Karimi, 2017; Smith, 1968)。アミノ酸は細胞内の浸透濃度を高めて凝固点を降下させるほか、フェノール化合物が抗酸化作用によって凍結および融解時のストレスによって生じる活性酸素種 (ROS) を消去し、細胞膜の過酸化を防ぐことで耐凍性に寄与する可能性が考えられる。なお、木本植物においては、低温馴化期に細胞膜を構成する脂質組成や脂肪酸組成が変化し、低温下での膜流動性を保持することが知られているが (酒井, 1982)、本研究では測定対象としていない。今後は、メタボロミクス解析などの網羅的手法を用いることで、今回測定できなかった成分を含めた各種成分の生理的役割を明確にするとともに、年次反復試験を通じて各成分の一貫した季節変動傾向を検証することが望まれる。

ブドウ越冬芽の耐凍性には、含水率と組織内成分以外に、形態的要因も影響する。越冬芽では、芽軸部に存在するペクチン質の透水性バリアおよび維管束の断絶によって、当年生枝からの氷の伝播が防がれ、越冬芽全体の過冷却状態が維持される (Jones et al., 2000)。一方、脱馴化の進行に伴って、越冬芽の内部で道管が発達し、越冬芽と当年生枝が接続されると、氷の伝播が可能となり過冷却能は低下する (Kasuga et al., 2023)。細胞レベルでは、Cryo-SEM 観察により、耐凍性の高いブドウ越冬芽において細胞の体積縮小を伴う部分的な凍結脱水が生じ、これが越冬芽細胞内の氷晶形成の抑制に寄与することが示されている (Kasuga et al., 2020)。Kasuga et al. (2023) では、*V. amurensis* との交配品種である‘山幸’において、一般的な *V. vinifera* では冬季に見られない越冬芽における木部組織の発達が観察されており、これが交配品種の脱馴化の早さに寄与する可能性を示唆している。すなわち、本研究で認められた耐凍性の品種間差には、代謝的な要因に加え、こうした形態学的な品種間差も複合的に寄与していると考えられる。

第 2 章では、第 1 章の知見に基づき、共通して耐凍性と関連がみられた含水量および可溶性炭水化物含量を説明変数とした耐凍性推定モデルを構築した。構築した 4 つのモデルのうち、可溶性炭水化物の種類ごとの異なる寄与を仮定した ISC モデルが最も高い予測精度 ($RMSEP_{LoYo} = 2.97^{\circ}C$) を示した。この結果は、可溶性炭水化物の種類によって耐凍性向上

への役割が異なるとする先行研究の結果を支持するものであり (Hinch et al., 2003; Nishizawa et al., 2008; Sakai, 1962; Sakai and Yoshida, 1968)、耐凍性への定量的な理解に向けた新たな知見を提供するものである。ただし、本研究に供試した材料は同一の圃場由来であるため、気象条件や栽培環境の違いについては反映しきれていない。今回構築したモデルの堅牢性を評価するためには、今後、複数の圃場においてモデルを適用し評価する必要がある。

一方、栽培現場での実用化を考慮した場合、本モデルの直接的適用には課題がある。モデルの説明変数である可溶性炭水化物含量の定量には HPLC 分析が不可欠であり、一般にそのような設備を持たない生産現場において迅速に測定することは困難である。伊東ら (2021) は、ニホンナシにおいてポータブル糖度計を用いた導管液 Brix 値から脇花芽の耐凍性を予測する回帰式を提案し、簡易的指標の有効性を報告している。ブドウにおいても、可溶性炭水化物含量を反映する代替指標や簡便な測定手法を確立し、本研究のモデルを統合することで、生産現場に適用可能な耐凍性推定モデルの構築が期待される。さらに、本研究で構築したモデルはあくまで測定時点における耐凍性を推定するものであるが、実際の栽培管理においては、凍害リスクを事前に察知し対策を講じることが求められる。将来の予測を行うためには気象データの活用が不可欠であるが、気温などの環境要因が耐凍性の変化として現れるまでには、遺伝子発現や酵素活性の変化を経た代謝プロファイルの改変など、複雑な生理プロセスとタイムラグが介在する (Londo et al., 2018; Ren et al., 2023; Wang et al., 2024)。そのため、環境要因と組織内成分、含水量を同一の次元で説明変数として扱う単純な統計モデルでは、こうした動的な因果関係を正確に反映することは困難であると推察される。したがって、まずは気象データから組織内成分や含水率の推移をシミュレーションするサブモデルを開発し、それを本研究の生理モデルと連結させる段階的なアプローチが必要となる。本研究で得られた代謝生理学的知見を基盤とし、予測システムへと発展させるこの取り組みが、気候変動下にある寒冷地ブドウ栽培の持続的な発展に資する重要な将来的課題である。

摘要

本研究は、寒冷地で栽培される醸造用ブドウにおいて、越冬芽および当年生枝の耐凍性に寄与する組織内成分を明らかにするとともに、それらの知見に基づき耐凍性を高精度に推定するモデルを構築することを目的とした。

第1章第1節では、北海道で広く栽培される醸造用ブドウ9品種に加えて新品種‘メイヴ’を含む計10品種を対象に、越冬芽の耐凍性の季節変動を品種間比較するとともに、含水率および可溶性炭水化物含量との関連を解析した。示差熱分析により評価した耐凍性は、*V. vinifera* 以外の交配品種である‘山幸’、‘セイベル 13053’、‘清舞’、‘清見’、‘デラウェア’、‘メイヴ’の順に高く、*V. vinifera* 4品種はそれに次ぎ、‘ケルナー’、‘ピノ・ノワール’、‘ツヴァイゲルトレーベ’、‘ミュラートルガウ’がこれに続いた。多くの品種において、LTE は含水率と正の相関を、可溶性炭水化物、特にグルコースとラフィノースとは負の相関を示した。

第1章第2節では、特に低温馴化期に着目し、北海道で最も栽培面積の多い *V. vinifera* 品種‘ピノ・ノワール’および‘ケルナー’ならびに、耐凍性の高いブドウ属交配品種である‘メイヴ’の越冬芽および当年生枝を対象に、耐凍性の季節変動と、可溶性炭水化物、プロリン、総ポリフェノール量との関連を調べた。電解質漏出法による耐凍性評価の結果、いずれの部位においても‘メイヴ’は *V. vinifera* の2品種よりも高い耐凍性を示した。冬季の‘メイヴ’では、越冬芽ではスクロースが、当年生枝では全ての可溶性炭水化物含量が *V. vinifera* の2品種よりも多く、これらの可溶性炭水化物の蓄積が高い耐凍性に寄与した可能性が示唆された。一方で、プロリンおよび総ポリフェノール量については、本節では耐凍性との有意な関連は検出されなかった。

第1章第3節では、耐凍性に寄与する組織内成分をより広く探るため、越冬芽および当年生枝の耐凍性と含水率、可溶性炭水化物、アミノ酸、フェノール化合物含量との関連を調べた。また、電解質漏出法と示差熱分析さらに Cryo-SEM による凍結挙動（深過冷却や過冷却打破など）の観察を比較し、越冬芽および当年生枝の耐凍性評価手法の妥当性を検証した。当年生枝は細胞内凍結に伴う発熱が少ないために LTE が検出されず、示差熱分析による耐凍性評価には適さない可能性が示唆された。越冬芽では電解質漏出法による LT₅₀ が示差熱分析による LTE よりも数度から十数度低温を示し、また、Cryo-SEM の観察結果は LTE の妥当性を支持した。耐凍性と組織内成分との関連解析では、越冬芽および当年生枝のいずれも、全品種で LTE または LT₅₀ と含水率との間には正の相関を、単糖および総可溶性炭水化物は負の相関を示した。また、一部の品種では、アルギニン、トリプトファン、レスベラトロールが負の相関を示し、当年生枝では RFO、アスパラギン、エピカテキン、ヴィニフェリ

ンも LT_{50} と負の相関を示した。

第 2 章では、第 1 章で共通して耐凍性との関連が認められた含水率および可溶性炭水化物含量に着目し、これらを説明変数とした耐凍性推定モデルを 4 種類構築し、その性能を比較した。各可溶性炭水化物が耐凍性に及ぼす影響が異なると仮定した ISC (Individual Soluble Carbohydrate) モデルが最も良好な結果を示し、 $RMSE = 2.55^{\circ}C$ 、 $RMSEP_{LOYO} = 2.97^{\circ}C$ 、Adj. $R^2 = 0.756$ であった。これは可溶性炭水化物の種類によって耐凍性向上への役割が異なるとする先行研究の結果を支持するものであった。以上の成果は、寒冷地における醸造用ブドウの耐凍性発現メカニズムの理解を深化させるとともに、耐凍性を指標とした品種育成や栽培管理の高度化に資する基礎的知見を提供するものである。

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、多大なるご指導ご鞭撻を賜った、北海道大学大学院農学院特任教授 鈴木卓博士、同講師 実山豊博士に心から感謝の意を表する。さらに、北海道大学大学院農学院准教授 荒川圭太博士、同教授 志村華子博士には、ご多忙の中、本論文の御校閲、御指導を賜った。ここに厚く御礼を申し上げる。

LC-MS 分析の前処理方法について、一から懇切丁寧にご指導いただいた北海道大学大学院農学院教授 松浦秀幸博士に感謝申し上げます。Cryo-SEM の使用に当たり、実験遂行上多大なご協力を賜った北海道大学農学研究院生物組織構造解析センター技術専門職員 安井雅範博士に感謝申し上げます。

国立研究開発法人農業・食品技術総合研究機構北海道農業研究センター 北岡哲博士には、研究について有益なご助言を賜った。ここに感謝申し上げます。

トリノ大学農学院教授 Paolo Sabbatini 博士、同助教 Stefania Savoi 博士には、本研究についてブドウ栽培学およびブドウ生理学の立場から様々なご助言をいただくとともに、ブドウ栽培の理論についてご教示いただいた。心より感謝申し上げます。

さっぽろワイン株式会社南康太氏、西原可克氏、さっぽろ藤野ワイナリー小沼寛晃氏、八剣山ワイナリー松尾洋氏、松村圭介氏には実験遂行に際してご協力いただいた。心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、藤木卓巳氏、八木慎太郎氏、吉田芽生氏、尾崎優奈氏、小野色葉氏、熊谷大志氏をはじめ、北海道大学農学院 園芸学研究室の大学院生のご協力に負うところが大きかった。また、北海道大学農学・食資源学事務部 大滝里子氏には多くの激励の言葉とご協力をいただいた。

以上の各位に対し、心から感謝の意を表します。

引用文献

- Aleynova, O. A., Z. V. Ogneva, A. R. Suprun, A. A. Ananov, N. N. Nityagovsky, A. A. Beresh, A. S. Dubrovina and K. V. Kiselev. 2024. The effect of external treatment of *Arabidopsis thaliana* with plant-derived stilbene compounds on plant resistance to abiotic stresses. *Plants* 13:184.
- Al-Saif, M. A., Hosny F. Abdel-Aziz, Haitham El-khamissi, Ahmed F. Abd El-Hakim, Abd El-wahed N., Abd El-wahed, Ibrahim A. Elnaggar, Mohammed H. Farouk, Ashraf E. Hamdy and Eman M. Hammad. 2024. Morphological, physiological, and biochemical responses of some olive tree cultivars to low temperature stress. *Bioresources* 19:9582–9605.
- Antivilo, F. G., R. C. Paz, J. Tognetti, M. Keller, M. Cavagnaro, E. E. Barrio and F. Roig Juñent. 2020. Winter injury to grapevine secondary phloem and cambium impairs budbreak, cambium activity, and yield formation. *J Plant Growth Regul* 39:1095–1106.
- Arakawa, K., J. Kasuga and N. Takata. 2018. Mechanism of overwintering in trees. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. vol. 1081. Springer New York LLC. 129–147.
- Ashraf, M. and M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59:206–216.
- Badulescu, R. and M. Ernst. 2006. Changes of temperature exotherms and soluble sugars in grapevine (*Vitis vinifera* L.) buds during. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 80:165–170.
- Baffoin, R., G. Charrier, A. E. Bouchardon, M. Bonhomme, T. Améglio and A. Lacointe. 2021. Seasonal changes in carbohydrates and water content predict dynamics of frost hardiness in various temperate tree species. *Tree Physiol* 41:1583–1600.
- Behrooz, M. Z., R. Karimi, M. Rasouli and M. Rostami. 2025. Evaluation of four training systems for inducing physiological and biochemical changes related to winter cold hardiness of two grapevine cultivars. *Int J Hortic Sci Technol* 12:613–626.
- Cai, Y., J. Yan, Q. Li, Z. Deng, S. Liu, J. Lu and Y. Zhang. 2019. Sucrose transporters of resistant grapevine are involved in stress resistance. *Plant Mol Biol* 100:111–132.
- Charrier, G., M. Poirier, M. Bonhomme, A. Lacointe and T. Améglio. 2013. Frost hardiness in walnut trees (*Juglans regia* L.): How to link physiology and modelling? *Tree Physiol* 33:1229–

1241.

- Dami, I. E., S. Ennahli and Y. Zhang. 2012. Assessment of winter injury in grape cultivars and pruning strategies following a freezing stress event. *Am J Enol Vitic* 63:106–111.
- Daskalakis, I., M. Stavrakaki, K. Sotirakoglou and K. Biniari. 2021. Variations in the levels of individual phenolic compounds in grapevine latent buds during eco-dormancy, following chemically-induced stress conditions. *Agronomy* 11:1798.
- Eris, A. 1982. Amino acids in grape buds during dormancy. University of California Davis. “Grape and Wine Centennial Symposium Proceedings” 53–55.
- Ershadi, A., R. Karimi and K. N. Mahdei. 2016. Freezing tolerance and its relationship with soluble carbohydrates, proline and water content in 12 grapevine cultivars. *Acta Physiol Plant* 38:1–10.
- Fennell, A. 2004. Freezing tolerance and injury in grapevines. *J Crop Improv* 10:201–235.
- Ferguson, J. C., M. M. Moyer, L. J. Mills, G. Hoogenboom and M. Keller. 2014. Modeling Dormant Bud Cold Hardiness and Budbreak in 23 *Vitis* Genotypes Reveals Variation by Region of Origin. *Am J Enol Vitic* 65:59–71.
- Ferguson, J. C., J. M. Tarara, L. J. Mills, G. G. Grove and M. Keller. 2011. Dynamic thermal time model of cold hardiness for dormant grapevine buds. *Ann Bot* 107:389–396.
- Fisher, K. H. 1980. Interspecific hybrids used in breeding wine grapes for southern ontario, canada (43 degrees north latitude). *Proceedings of the Third International Symposium on Grape Breeding* 1980: 12-20.
- Fujie, M., M. Kawamitsu and H. Saze. 2025. De novo genome assembly of an interspecific hybrid grapevine ‘Maeve.’ *bioRxiv*, doi.org/10.1101/2025.03.24.644857.
- Fujikawa, S. and K. Miura. 1986. Plasma membrane ultrastructural changes caused by mechanical stress in the formation of extracellular ice as a primary cause of slow freezing injury in fruit-bodies of Basidiomycetes (*Lyophyllum ulmarium* (Fr.) Kühner). *Cryobiology* 23:371–382.
- Ghosh, U. K., M. N. Islam, M. N. Siddiqui, X. Cao and M. A. R. Khan. 2022. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biol* 24:227–239.

- Grant, T. and I. Dami. 2015. Physiological and biochemical seasonal changes in *Vitis* genotypes with contrasting freezing tolerance. *Am J Enol Vitic* 66:195–203.
- Grant, T. N., I. E. Dami, T. Ji, D. Scurlock and J. Streeter. 2009. Variation in leaf and bud soluble sugar concentration among *Vitis* genotypes grown under two temperature regimes. *Canadian J Plant Sci* 89:961–968.
- Hamman, R. A., I. E. Dami, T. M. Walsh and C. Stushnoff. 1996. Seasonal carbohydrate changes and cold hardiness of chardonnay and riesling grapevines. *Am J Enol Vitic* 47:31–36.
- Hébert-Haché, A., J. J. Willwerth, B. Kemp and D. L. Inglis. 2025. The relationships between dehydrins, cold hardiness, and the ambient temperature: comparing a cold hardy to a cold tender *Vitis vinifera* L. cultivar. *Canadian J Plant Sci* 105:1–12.
- Hébert-Haché, A., J. J. Willwerth, B. Kemp and D. L. Inglis. 2023. Correlation between dehydrin-like proteins and cold hardiness of grapevine. *Canadian J Plant Sci* 103:494–506.
- Hincha, D. K., E. Zuther and A. G. Heyer. 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1612:172–177.
- Hiraga, Y. and T. Matsumoto. 2025. Viticulture suitability estimates under climate change in Japan. *Theor Appl Climatol* 156:671.
- Horikawa, K., T. Hirama, H. Shimura, Y. Jitsuyama and T. Suzuki. 2019. Visualization of soluble carbohydrate distribution in apple fruit flesh utilizing MALDI-TOF MS imaging. *Plant Sci* 278:107–112.
- Horiuchi, R., K. Arakawa, J. Kasuga, T. Suzuki and Y. Jitsuyama. 2021. Freezing resistance and behavior of winter buds and canes of wine grapes cultivated in northern Japan. *Cryobiology* 101:44–51.
- IPCC, 2022. In: Portner, H.-O., Roberts, D.C., Tignor, M., Poloczanska, E.S.,Mintenbeck, K., Alegría, A., et al. (Eds.), *Climate Change 2022: impacts, adaptation, and vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel On Climate Change*. Cambridge University Press.
- Ishikawa, M., & Sakai, A. 1981. Freezing Avoidance Mechanisms by Supercooling in Some *Rhododendron* flower Buds with Reference to Water Relations 12. *Plant Cell Physiol*, 22: 953–

- Ishikawa, M., & Sakai, A. 1985. Extraorgan freezing in wintering flower buds of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Plant, Cell & Environment*, 8: 333–338.
- Ithal, N. and A. R. Reddy. 2004. Rice flavonoid pathway genes, *OsDfr* and *OsAns*, are induced by dehydration, high salt and aba, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, *OsC1-MYB*. *Plant Sci* 166:1505–1513.
- Jones, G. V., M. A. White, O. R. Cooper and K. Storchmann. 2005. Climate change and global wine quality. *Clim Change* 73:319–343.
- Jones, K. S., B. D. Mckersie and J. Paroschy. 2000. Prevention of ice propagation by permeability barriers in bud axes of *Vitis vinifera*. *Canadian J Bot* 78:3–9.
- Jones, K. S., J. Paroschy, B. D. McKersie and S. R. Bowley. 1999. Carbohydrate composition and freezing tolerance of canes and buds in *Vitis vinifera*. *J Plant Physiol* 155:101–106.
- Jun, S. H., D. J. Yu, Y. Y. Hur and H. J. Lee. 2021. Identifying reliable methods for evaluating cold hardiness in grapevine buds and canes. *Hortic Environ Biotechnol* 62:871–878.
- Jun, S. H., D. J. Yu, D. Im, Y. Y. Hur and H. J. Lee. 2024. Comparison of mid-winter cold hardiness in the bud and cane tissues of 24 grape cultivars based on low-temperature exotherm and electrolyte leakage analyses. *Hort Sci Technol* 42:689–700.
- Karimi, M., A. Ebadi, S. A. Mousavi, S. A. Salami and A. Zarei. 2015. Comparison of CBF1, CBF2, CBF3 and CBF4 expression in some grapevine cultivars and species under cold stress. *Sci Hortic* 197:521–526.
- Karimi, R. 2020. Cold hardiness evaluation of 20 commercial table grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Int J Fruit Sci* 20:433–450.
- Karimi, R. 2017. Potassium-induced freezing tolerance is associated with endogenous abscisic acid, polyamines and soluble sugars changes in grapevine. *Sci Hortic* 215:184–194.
- Karlson, D. T., Y. Zeng, V. E. Stirm, R. J. Joly and E. N. Ashworth. 2003. Photoperiodic regulation of a 24-kd dehydrin-like protein in red-osier dogwood (*Cornus sericea* L.) in relation to freeze-tolerance. *Plant Cell Physiol* 44:25–34.
- Kasuga, J., Y. Hashidoko, A. Nishioka, M. Yoshiba, K. Arakawa and S. Fujikawa. 2008. Deep

- supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant Cell Environ* 31:1335–1348.
- Kasuga, J., Y. Tsumura, D. Kondoh, Y. Jitsuyama, R. Horiuchi and K. Arakawa. 2020. Cryo-scanning electron microscopy reveals that supercooling of overwintering buds of freezing-resistant interspecific hybrid grape ‘Yamasachi’ is accompanied by partial dehydration. *J Plant Physiol* 253:153248.
- 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. *Physiol Plant* 175:13940
- Kasuga, J., Endoh, K., Yoshiba, M., Taïdo, I., Arakawa, K., Uemura, M., & Fujikawa, S. 2012. Roles of cell walls and intracellular contents in supercooling capability of xylem parenchyma cells of boreal trees. *Physiologia Plantarum*, 148: 25–35.
- Kaya, Ö. 2020. Some Methods Used To Measure The Cold Hardiness Of Grapevine Dormant Buds. INTERNATIONAL BOOK CHAPTER, IVPE- Cetinje, Montenegro, CHAPTER III pp. 23-40.
- Kaya, Ö. and C. Köse. 2017. Determination of resistance to low temperatures of winter buds on lateral shoot present in Karaerik (*Vitis vinifera* L.) grape cultivar. *Acta Physiol Plant* 39:1–9.
- Kaya, Ö., H. Delavar, A. Shikanai, C. Auwarter and H. Hatterman-Valenti. 2024. Assessing the influence of autumnal temperature fluctuations on cold hardiness in different grapevine cultivars: variations across vine age and bud positions. *Front Plant Sci* 15:1379328
- Kita, Y., T. Suzuki and Y. Jitsuyama. 2024. Relationships between freezing resistance and biochemicals in grapevine buds and canes: Different soluble carbohydrates accumulate in several cultivars during cold acclimation. *Plant Stress* 14:100639.
- Kliewer, W. M. and J. A. Cook. 1971. Arginine and Total Free Amino Acids As Indicators of the Nitrogen Status of Grapevines. *J Amer Soc Hort Sci* 96:581–587.
- Koster, K. L., & Leopold, A. C. 1988. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiol* 88: 829–832.
- Koster, K. L., & Lynch, D. V. 1992. Solute Accumulation and Compartmentation during the Cold

Acclimation of Puma Rye. *Plant Physiol*, 98:108–109.

- Koussa, T., L. Aicha Rifai and M. Cherrad. 2005. Annual variations of alpha-amylase and invertases activities in buds and internodes of grapevines and their relation with carbohydrates and abscisic acid contents. *Oeno One* 39:129–136.
- Kovaleski, A. P., J. P. Londo and K. D. Finkelstein. 2019. X-ray phase contrast imaging of *vitis* spp. buds shows freezing pattern and correlation between volume and cold hardiness. *Sci Rep* 9:14949.
- Kovaleski, A. P., M. G. North, T. E. Martinson and J. P. Londo. 2023. Development of a new cold hardiness prediction model for grapevine using phased integration of acclimation and deacclimation responses. *Agric For Meteorol* 331: 109324
- Kovács, L. G., P. L. Byers, M. L. Kaps and J. Saenz. 2003. Dormancy, cold hardiness, and spring frost hazard in *vitis amurensis* hybrids under continental climatic conditions. *Am J Enol Vitic* 54:8–54.
- Kupina, S., C. Fields, M. R. C and S. B. L. 2018. Determination of total phenolic content using the folin-c assay: single-laboratory validation, first action 2017.13. *J AOAC Int* 101:1466–1473.
- Kuwabara, C., D. Wang, K. Endoh, Y. Fukushi, K. Arakawa and S. Fujikawa. 2013. Analysis of supercooling activity of tannin-related polyphenols. *Cryobiology* 67:40–49.
- Kuwabara, C., J. Kasuga, D. Wang, Y. Fukushi, K. Arakawa, T. Koyama, T. Inada and S. Fujikawa. 2011. Change of supercooling capability in solutions containing different kinds of ice nucleators by flavonol glycosides from deep supercooling xylem parenchyma cells in trees. *Cryobiology* 63:157–163.
- Kuwabara, C., D. Wang, J. Kasuga, Y. Fukushi, K. Arakawa, T. Koyama, T. Inada and S. Fujikawa. 2012. Freezing activities of flavonoids in solutions containing different ice nucleators. *Cryobiology* 64:279–285
- Lee, M. R., C. S. Kim, T. Park, Y. S. Choi and K. H. Lee. 2018. Optimization of the ninhydrin reaction and development of a multiwell plate-based high-throughput proline detection assay. *Anal Biochem* 556:57–62.
- Li, L., Y. Niu, S. Deng, M. Zhu, X. Wu, S. Peng, W. Suo, Y. Zheng, L. Zhang and Y. Guan. 2025.

- Metabolomics analysis to characterize the effects of flavonoids on tobacco seedlings under cold and hypoxia stress. *J Plant Interact* 20: 2474825
- Li, Q., H. Zhou, F. Chai, Z. Wang, L. Fang, W. Duan, P. Fan, Z. Liang, S. Li, Q. Wang and H. Xin. 2024. Identification of potential metabolites responsible for cold tolerance in buds of *Vitis amurensis*. *Hortic Plant J* 11:175–188.
- Liu, Z. and S. Rochfort. 2013. A fast liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for quantification of major polar metabolites in plants. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 912:8–15.
- Londo, J.P., Kovaleski, A.P., Lillis, J.A., 2018. Divergence in the transcriptional landscape between low temperature and freeze shock in cultivated grapevine (*Vitis vinifera*). *Hortic Res* 5:10.
- Londo, J. P. and A. P. Kovaleski. 2025. Integrating cold hardiness and deacclimation resistance demonstrates a conserved response to chilling accumulation in grapevines. *J Exp Bot* 76:3158–171.
- Maoz, I., M. De Rosso, T. Kaplunov, A. D. Vedova, N. Sela, R. Flamini, E. Lewinsohn and A. Lichter. 2019. Metabolomic and transcriptomic changes underlying cold and anaerobic stresses after storage of table grapes. *Sci Rep* 9:2917.
- Mills, L. J., J. C. Ferguson and M. Keller. 2006. Cold-hardiness evaluation of grapevine buds and cane tissues. *Am J Enol Vitic* 57:194–200.
- Nassar, R.A., Kliever, W.M., 1966. Free amino acids in various parts of vitis vinifera at different stages of development. *Proceed Amer Soc Hort Sci* 89, 281–294.
- Nemoto, M., T. Hirota and T. Sato. 2016. Prediction of climatic suitability for wine grape production under the climatic change in Hokkaido. *J Agr Meteorol* 72:167–172.
- Nishizawa, A., Y. Yabuta and S. Shigeoka. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* 147:1251–1263.
- Noronha, H., A. Silva, T. Silva, S. Frusciante, G. Diretto and H. Gerós. 2022. *VviRafS5* is a raffinose synthase involved in cold acclimation in grapevine woody tissues. *Front Plant Sci* 12: 754537
- North, M., B. A. Workmaster and A. Atucha. 2022. Effects of chill unit accumulation and temperature on woody plant deacclimation kinetics. *Physiol Plant* 174:e13717.

- North, M. G. and A. P. Kovaleski. 2024. Time to budbreak is not enough: cold hardiness evaluation is necessary in dormancy and spring phenology studies. *Ann Bot* 133:217–224.
- Ogneva, Z. V., O. A. Aleynova, A. R. Suprun, Y. A. Karetin, A. S. Dubrovina and K. V. Kiselev. 2021. Tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing grapevine *VaSTS1* or *VaSTS7* genes to cold, heat, drought, salinity, and ultraviolet irradiation. *Biol Plant* 65:111–117.
- Poirier, M., A. Lacointe and T. Améglio. 2010. A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. *Tree Physiol* 30:1555–1569.
- Poni, S., P. Sabbatini and A. Palliotti. 2022. Facing spring frost damage in grapevine: recent developments and the role of delayed winter pruning – A review. *Am J Enol Vitic* 73:210–225.
- Proebsting, E. L., M. Ahmedullah and V. P. Brummund. 1980. Seasonal changes in low temperature resistance of grape buds. *Am J Enol Vitic* 31:329–336.
- Qsaib, S., N. Mateus, F. Ez-Zohra Ikbali, L. A. Rifai, V. De Freitas and T. Koussa. 2014. Direct Identification and characterization of phenolic compounds from crude extracts of buds and internodes of grapevine (*Vitis vinifera* cv Merlot). *Nat Prod Commun* 9:1569–1572.
- Rahemi, A., H. Fisher, K. Carter and T. Taghavi. 2022. Mitigating grapevine winter damage in cold climate areas. *Hort Sci* 49:59–70.
- Rasmussen, D. H. and A. P. Mackenzie. 1972. Effect of Solute on Ice-Solution Interfacial Free Energy; Calculation from Measured Homogeneous Nucleation Temperatures. In: Jellinek HHG (ed) *Water Structure at the Water-Polymer Interface*. Plenum Press, New York, 126–145.
- Ren, C., P. Fan, S. Li and Z. Liang. 2023. Advances in understanding cold tolerance in grapevine. *Plant Physiol* 192:1733–1746.
- Robinson, J., J. Harding and J. Vouillamoz. 2012. ワイン用葡萄品種大事典ー1,368品種の完全ガイドー, 1st ed. 北山雅彦, 北山薫, 後藤奈美 (訳), 共立出版 2019.
- De Rosa, V., R. Falchi, E. Moret and G. Vizzotto. 2022. Insight into carbohydrate metabolism and signaling in grapevine buds during dormancy progression. *Plants* 11: 1027.
- Rubio, S., X. Noriega and F. J. Pérez. 2019. ABA promotes starch synthesis and storage metabolism in dormant grapevine buds. *J Plant Physiol* 234–235:1–8.

- Sakai, A. 1962. Studies on the frost-hardiness of woody plants; 1. The causal relation between sugar content and frost-hardiness. Contributions from the Institute of Low Temperature Science 11:1–40.
- Sakai, A. and S. Yoshida. 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. Cryobiology 5:160–174.
- Sakai, Akira. and Walter. Larcher. 1987. Frost survival of plants: Responses and adaptation to freezing stress. Springer, Berlin Heidelberg
- Sakamoto, D., K. Fujikawa, T. Sakaue, H. Inoue, A. Ito, T. Moriguchi, A. Higashi and T. Sugiura. 2017. Application of livestock waste compost as a source of nitrogen supplementation during the fall-winter season causes dead flower buds in Japanese pear ‘Kosui.’ Horticulture Journal 86:19–25.
- Sarikhani, H., H. Delgarm and S. Mansouri. 2020. Physiological impacts of early defoliation on the cold hardiness of grapevine (*Vitis vinifera* L.) “Sultana.” Vitis 59:141–147.
- Schulz, E., T. Tohge, E. Zuther, A. R. Fernie and D. K. Hincha. 2015. Natural variation in flavonol and anthocyanin metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* accessions. Plant Cell Environ 38:1658–1672.
- Song, X. P., H. Li, P. Potapov and M. C. Hansen. 2022. Annual 30 m soybean yield mapping in Brazil using long-term satellite observations, climate data and machine learning. Agric For Meteorol 326: 109186.
- Steponkus, P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. Annu Rev Plant Biol 35:543–584.
- Strimbeck, G. R., P. G. Schaberg, C. G. Fossdal, W. P. Schröder and T. D. Kjellsen. 2015. Extreme low temperature tolerance in woody plants. Front Plant Sci 6:884.
- Svyantek, A., B. Köse, J. Stenger, C. Auwarter and H. Hatterman-Valenti. 2020. Cold-hardy grape cultivar winter injury and trunk re-establishment following severe weather events in North Dakota. Horticulturae 6:75.
- Swanson, C. A. and E. D. H. El-Shishiny. 1958. Translocation of sugars in the concord grape. Plant Physiol 33:33–37.
- Swiderski, A., P. Muras and H. Koloczek. 2004. Flavonoid composition in frost-resistant

- Rhododendron cultivars grown in Poland. *Sci Hortic* 100:139–151.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571–599.
- Todaro, T. M. and I. E. Dami. 2017. Cane morphology and anatomy influence freezing tolerance in *Vitis vinifera* Cabernet franc. *International Journal of Fruit Science* 17:391–406.
- Tsumura, Y., H. Azuma, Y. Takahashi, A. Atucha, N. Hirano and J. Kasuga. 2019. Cold hardiness of wine grape variety “Kiyomi” during dormant season in Tokachi area. *Cryobiol Cryotechnol* 65:75–79.
- Wample, R. L., S. E. Spayd, R. G. Evans and R. G. Stevens. 1993. Nitrogen fertilization of white riesling grapes in washington: nitrogen seasonal effects on bud cold hardiness and carbohydrate reserves. *Am J Enol Vitic* 44:159–167.
- Wang, D., J. Kasuga, C. Kuwabara, K. Endoh, Y. Fukushi, S. Fujikawa and K. Arakawa. 2012. Presence of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) hydrolyzable tannins in deep supercooling xylem parenchyma cells in *Cercidiphyllum japonicum*. *Planta* 235:747–759.
- Wang, H., J. J. Blakeslee, M. L. Jones, L. J. Chapin and I. E. Dami. 2020. Exogenous abscisic acid enhances physiological, metabolic, and transcriptional cold acclimation responses in greenhouse-grown grapevines. *Plant Science* 293:110437.
- Wang, H., Kovalski, A.P., Londo, J.P., 2024. Physiological and transcriptomic characterization of cold acclimation in endodormant grapevine under different temperature regimes. *Physiol Plant* 176:14607.
- Wang, H., G. D. Moghe, A. P. Kovalski, M. Keller, T. E. Martinson, A. H. Wright, J. L. Franklin, A. Hébert-Haché, C. Provost, M. Reinke, A. Atucha, M. G. North, J. P. Russo, P. Helwi, M. Centinari and J. P. Londo. 2024. NYUS.2: an automated machine learning prediction model for the large-scale real-time simulation of grapevine freezing tolerance in North America. *Hortic Res* 11:uhad286.
- Welling, A., P. Rinne, A. Viherä-Aarnio, S. Kontunen-Soppela, P. Heino and E. T. Palva. 2004. Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *J Exp Bot* 55:507–516.
- Wilson, P. E., D. D. Archbold, J. G. Masabni and S. Kaan Kurtural. 2014. Cropload management

- of “Vidal blanc” improves primary bud cold hardiness and maintains berry composition in the lower midwestern United States. HortSci 49:874–880.
- Wolf, K. T. and M. K. Cook. 1992. Seasonal deacclimation patterns of three grape cultivars at constant, warm temperature. Am J Enol Vitic 43:171–179.
- Wolf, K. T. and M. R. Pool. 1987. Factors affecting exotherm detection in the differential thermal analysis of grapevine dormant buds. J Amer Soc Hort Sci 112:520–525.
- Xie, Z., C. F. Forney and B. Bondada. 2018. Renewal of vascular connections between grapevine buds and canes during bud break. Sci Hortic 233:331–338.
- Xin, H., W. Zhu, L. Wang, Y. Xiang, L. Fang, J. Li, X. Sun, N. Wang, J. P. Londo and S. Li. 2013. Genome wide transcriptional profile analysis of *Vitis amurensis* and *Vitis vinifera* in response to cold stress. PLoS One 8: e58740.
- Zhang, J., X. Wu, R. Niu, Y. Liu, N. Liu, W. Xu and Y. Wang. 2012. Cold-resistance evaluation in 25 wild grape species. Vitis 51:153–160.
- Zhang, Y. and I. E. Dami. 2012. Foliar application of abscisic acid Increases freezing tolerance of field-grown *Vitis vinifera* Cabernet franc grapevines. Am J Enol Vitic 63:377–384.
- 伊東明子, 坂本大輔, 杉浦俊彦, 森口卓哉. 2021. 道管液糖含量を指標とした冬季のニホンナシ腋花芽の耐凍性の評価. 園学研 20:207–215.
- 大野宏之, 佐々木華織, 大原源二, 中園江 2016. 実況値と数値予報, 平年値を組み合わせたメッシュ気温・降水量データの作成. 生物と気象 16:71-79.
- 酒井昭. 1982. 植物の耐寒性と寒冷適応ー冬の生理・生態学ー 学会出版センター, pp. 1–469
- 酒井昭, 吉田静夫. 1983. 植物と低温. 東京大学出版会, pp.1–130
- 植物栄養実験法編集委員会. 1997. 植物栄養実験法. pp.207–208.
- 田中利忠, 石村実 2020. 湘南産ワイン用ブドウ新品種「メイヴ」発見と特徴の報告 (第1報). 日本ブドウ・ワイン学会誌 31:82–83.
- 永田修, 小林和彦, 丹羽勝久, 平川敦雄, 滝沢信夫, 小野悟, 矢崎友嗣, 広田知良. 2014. 日本農業気象学会2014年全国大会 オーガナイズドセッション報告 「ワイン産地としての北海道空知地域の将来展望」. 生物と気象 14:D18-28.
- 北海道農政部生産振興局農産振興課. 2022. 醸造用ぶどう導入の手引 (改訂第4版).

<https://www.pref.hokkaido.lg.jp/ns/nsk/kajyu/jouzouyoubudou.html>. 2025/12/6閲覧

北海道道立中央農業試験場園芸部果樹園芸科. 1981a. 醸造用ブドウの特性調査（醸造用ブドウ品種地域適応性試験）. <https://www.hro.or.jp/agricultural/center/result/kenkyuseika/gaiyosho/h03gaiyo/1990032.htm> 2025/11/17閲覧

北海道道立中央農業試験場園芸部果樹園芸科. 1981b. 醸造用ブドウ品種「セイベル13053」に関する試験. <https://www.hro.or.jp/agricultural/center/result/kenkyuseika/gaiyosho/S56gaiyo/1980052.htm>. 2025/11/17閲覧

北海道道立中央農業試験場園芸部果樹園芸科. 1981c. 醸造用ブドウ品種「ツバイゲルトレーベ」に関する試験. <https://www.hro.or.jp/agricultural/center/result/kenkyuseika/gaiyosho/S56gaiyo/1980053.htm>. 2025/11/17閲覧